(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6321633号
(P6321633)

(45)発行日　平成30年5月9日(2018.5.9)　(24)登録日　平成30年4月13日(2018.4.13)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	ZNA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 21　(全 329 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-516079(P2015-516079)
(86)(22)出願日　平成25年5月31日(2013.5.31)
(65)公表番号　特表2015-519906(P2015-519906A)
(43)公表日　平成27年7月16日(2015.7.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/043684
(87)国際公開番号　WO2013/184514
(87)国際公開日　平成25年12月12日(2013.12.12)
審査請求日　平成28年5月30日(2016.5.30)
(31)優先権主張番号　61/655,143
(32)優先日　平成24年6月4日(2012.6.4)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/777,430
(32)優先日　平成25年3月12日(2013.3.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　504389991
ノバルティス　アーゲー
スイス国　バーゼル　リヒトシュトラーセ　３５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】部位特異的標識法およびそれによって生成される分子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、抗体またはその断片の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含む修飾抗体またはその抗原結合断片であって、
前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型であり、
ペプチドタグが、
ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、
ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、
ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＣＬＮ（配列番号３）、
ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＣＬＮ（配列番号４）、
ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＬＬＮ（配列番号５）、
ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＳＬＮ（配列番号６）、
ＧＳＱＤＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号７）、
ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号８）、
ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、

ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、
ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、
ＧＤＳＬＤＭ（配列番号１５）、
ＬＤＳＶＲＭＭＡＬＡＡＲ（配列番号１６）、
ＬＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＲ（配列番号１７）、
ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、
ＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）、
ＤＶＬＤＳＬＥＦＩ（配列番号２０）、
ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳ（配列番号２１）、および
ＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）
からなる群から選択され、
前記ペプチドタグが、軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間に挿入されているか、または前記ペプチドタグが、ＣＨ１ドメインのアミノ酸残基１１９および１２０の間、もしくはアミノ酸残基１２０および１２１の間、もしくはアミノ酸残基１３５および１３６の間、もしくはアミノ酸残基１３６および１３７の間、もしくはアミノ酸残基１３８および１３９の間、もしくはアミノ酸残基１６２および１６３の間、もしくはアミノ酸残基１６４および１６５の間、もしくはアミノ酸残基１６５および１６６の間、もしくはアミノ酸残基１９４および１９５の間、もしくはアミノ酸残基１９５および１９６の間に挿入されているか、または前記ペプチドタグが、ＣＨ３ドメインのアミノ酸残基３８８および３８９の間に挿入されており、前記アミノ酸がEuナンバリングシステムによってナンバリングされている修飾抗体またはその抗原結合断片。

【請求項２】
前記ペプチドタグが、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、
ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、
ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、および
ＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）
からなる群から選択され、
前記ペプチドタグが、軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間に挿入されているか、またはＣＨ１ドメインのアミノ酸残基１１９および１２０の間、もしくはアミノ酸残基１２０および１２１の間、もしくはアミノ酸残基１３５および１３６の間、もしくはアミノ酸残基１３６および１３７の間、もしくはアミノ酸残基１６５および１６６の間、またはＣＨ３ドメインのアミノ酸残基３８８および３８９の間に挿入されている
請求項１に記載の修飾抗体またはその抗原結合断片。

【請求項３】
前記抗体が、配列番号３２、配列番号６３、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１４９、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６６、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６５、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号３５６、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７１、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８１、または配列番号３８４のいずれかを含む、請求項１または２に記載の修飾抗体またはその抗原結合断片。

【請求項４】
前記抗体が、配列番号１３２、配列番号３５６、配列番号３５８、配列番号３５９、配

列番号３６４、配列番号３６５または配列番号３７４を含む、請求項３に記載の修飾抗体またはその抗原結合断片。

【請求項５】

ヒトもしくはヒト化抗体またはその断片であるか、または

ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、およびＩｇＡから選択されるアイソタイプであるか、または

ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４から選択されるＩｇＧのサブタイプであるか、または

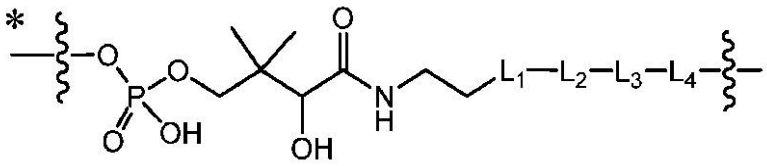
抗ＨＥＲ２抗体または抗ＨＥＲ２抗体断片である、請求項１から４のいずれか一項に記載の修飾抗体またはその抗原結合断片。

【請求項６】

請求項１から５のいずれか一項に記載の修飾抗体または抗原結合断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートであって、

前記末端基が、修飾抗体または抗原結合断片に、式（Ｉ－ｂ）による構造を有するリンカー：

【化１】



式(I－b)

［式中、

Ｌ$_1$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

Ｌ$_2$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

Ｌ$_3$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

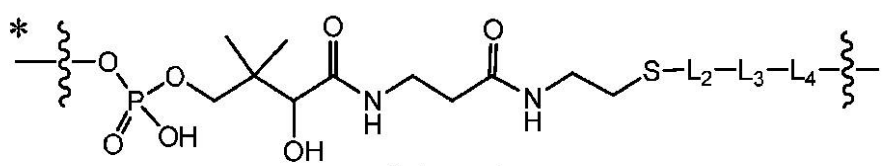
Ｌ$_4$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーであり、

＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合している場所を示す］によって結合しており、

末端基が、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、アセチル基、もしくは表面であるか、または

前記リンカーが式（１－ｃ）

【化２】



式(I－c)

の構造を有する、免疫コンジュゲート。

【請求項７】

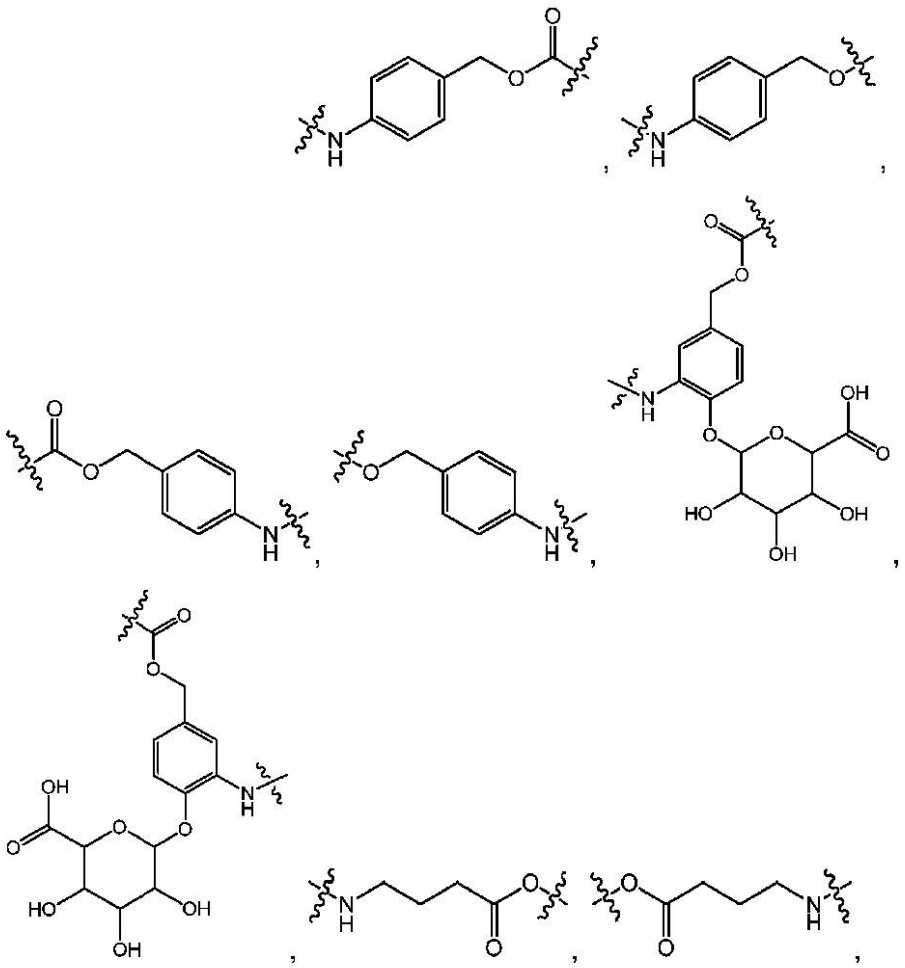
L_1が、－A_1X^2－または－X^2－であり、

L_2が、結合、－A_2－、または－A_2X^2－であり、

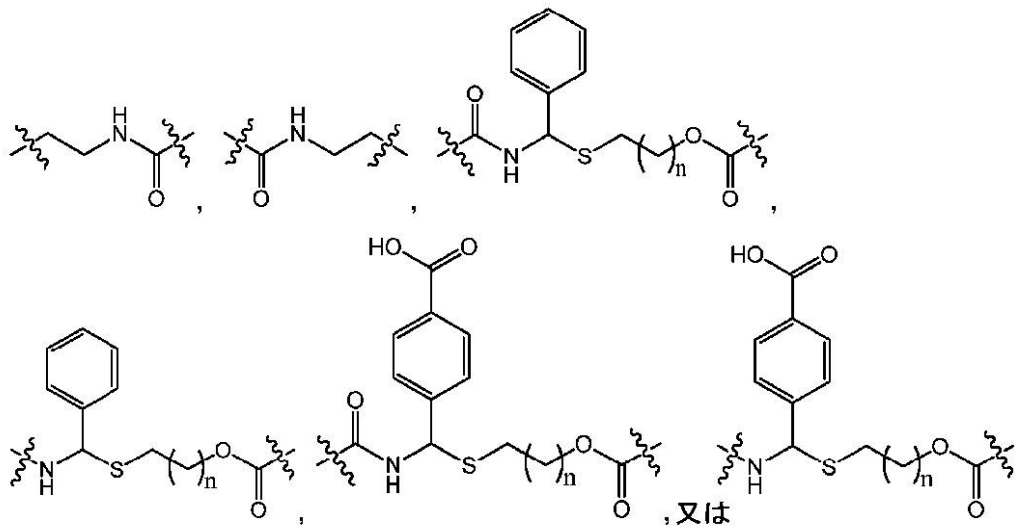
L_3が、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、

L_4が、結合、－A_4－、－A_4X^2－、

【化３－１】



【化３－２】

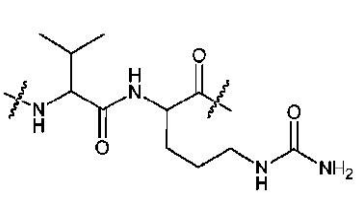


であり、

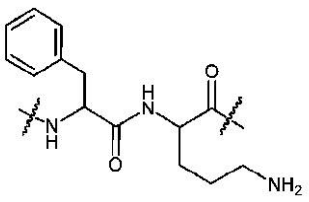
A_1が、－C（＝O）NH－、－NHC（＝O）－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

A_2が、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NR^4－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$S－、－（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【化４】



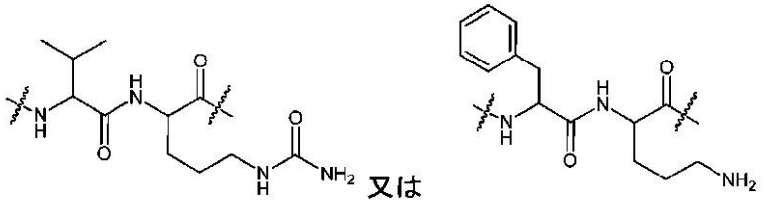
又は



であり、

A_3が、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$S－、－（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【化５】



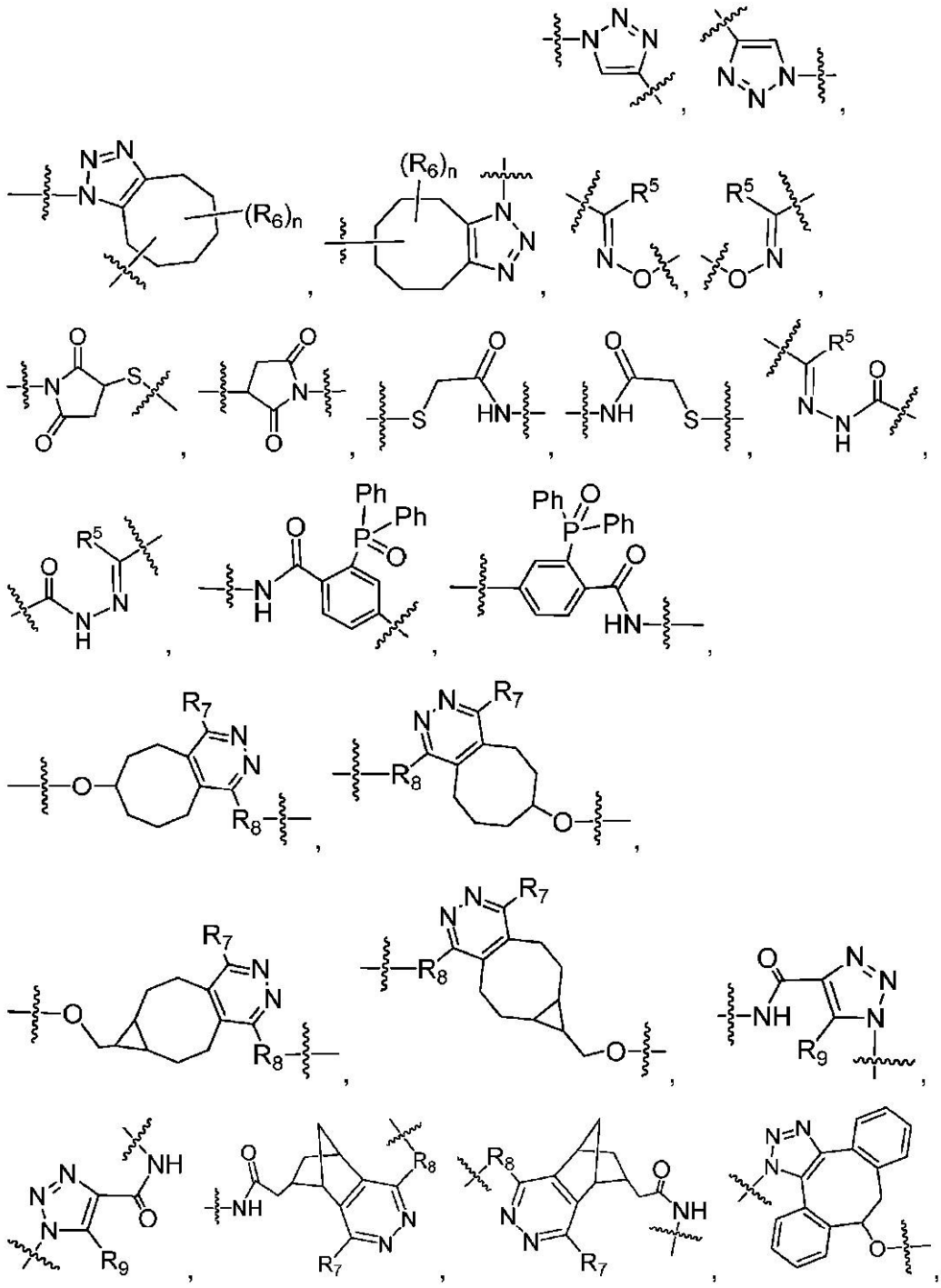
であり、

A_4が、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$

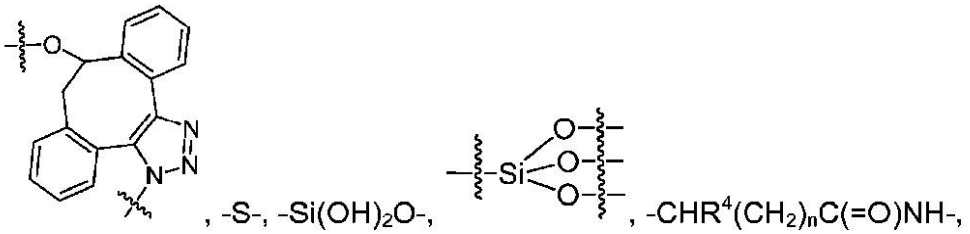
）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^2は、独立に、結合、

【化６】



【化７】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

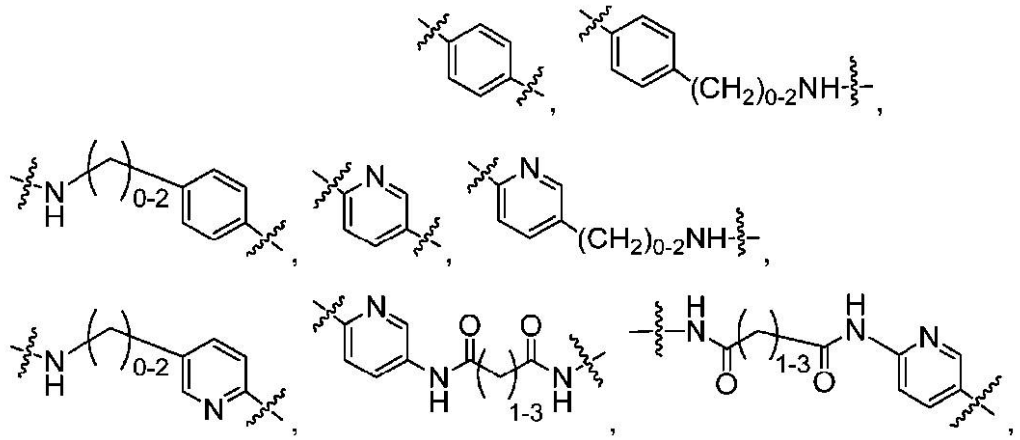
各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニルおよびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【化８】



から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

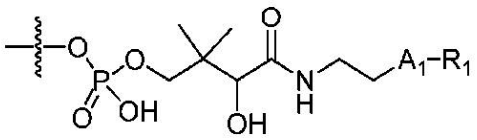
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される、請求項６に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項８】

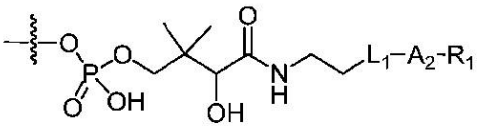
末端基が、抗炎症薬、抗癌薬、抗真菌薬、抗菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、麻酔薬、Ｖ－ＡＴＰアーゼ阻害薬、ＨＳＰ９０阻害薬、ＩＡＰ阻害薬、ｍＴｏｒ阻害薬、微小管安定薬、微小管不安定化薬、オーリスタチン、ドラスタチン、マイタンシノイド、ＭｅｔＡＰ（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質ＣＲＭ１の核外輸送の阻害薬、ＤＰＰＩＶ阻害薬、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害薬、タンパク質合成阻害薬、ＣＤＫ２阻害薬、ＣＤＫ９阻害薬、Ｅｇ５阻害薬、ＨＤＡＣ阻害薬、ＤＮＡ損傷薬、ＤＮＡアルキル化薬、ＤＮＡインターカレーター、ＤＮＡ小溝結合薬、プロテアソーム阻害薬、ＲＮＡポリメラーゼ阻害薬、およびＤＨＦＲ阻害薬から選択される部分であるか

、または
末端基が、フルオロフォア、クロモフォア、量子ドット、磁性プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、造影試薬またはアフィニティープローブから選択される請求項６から７のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項９】
有効量の請求項６から８のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩と、薬学的に許容される賦形剤、担体、または添加剤とを含む医薬組成物。
【請求項１０】
医薬として使用するための、請求項１から５のいずれかに記載の修飾抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項６から８のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１１】
癌、炎症性疾患、または感染症を治療する際に使用するための、請求項１から５のいずれかに記載の修飾抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項６から８のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１２】
癌を治療する際に使用するための、請求項１から５のいずれかに記載の修飾抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項６から８のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１３】
請求項１から５のいずれか一項に記載の修飾抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸。
【請求項１４】
請求項１３に記載の核酸を含む宿主細胞。
【請求項１５】
抗癌薬とさらにコンジュゲートしている、請求項１から５のいずれかに記載の修飾抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１６】
請求項６から８のいずれかに記載の免疫コンジュゲートを生成する方法であって、下記の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）
（ａ）適切な条件下で、請求項１から５のいずれか一項に記載の修飾抗体または抗体断片、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、およびＣｏＡに連結している末端基またはＣｏＡ類似体に連結している末端基をインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片および末端基を含む免疫コンジュゲートの形成を促進すること、
（ｂ）ｉ）適切な条件下で、請求項１から５のいずれか一項に記載の抗体または抗体断片を４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたはＣｏＡ類似体と共にインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を抗体または抗体断片に結合させるステップであって、４’－ホスホパンテテインおよび４’－ホスホパンテテイン類似体が官能基を含むステップ、および
ｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を、末端基に連結していてもよい反応性基と反応させ、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片および末端基を含む免疫コンジュゲートを形成するステップ、
（ｃ）ｉ）適切な条件下で、請求項１から５のいずれか一項に記載の抗体または抗体断片を４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたはＣｏＡ類似体と共にインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を抗体または抗体断片に結合させるステップであって、４’－ホスホパンテテインおよび４’－ホスホパンテテイン類似体が保護官能基を含むステップ、
ｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体の保護官能基

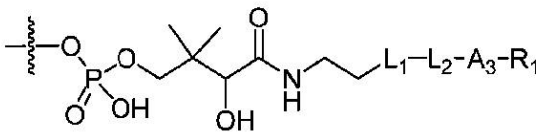
を脱保護するステップ、および
ｉｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体の脱保護官能基を、末端基に連結していてもよい反応性基と反応させ、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片および末端基を含む免疫コンジュゲートを形成するステップを含む方法。
【請求項１７】
前記適切な条件が、４℃～３７℃の温度およびｐＨ６．５～ｐＨ９．０を含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記修飾抗体または抗体断片中のペプチドタグのセリン残基が、式（Ｄ－ａ）、式（Ｅ－ａ）、式（Ｆ－ａ）、または式（Ｇ－ａ）の構造を有する４’－ホスホパンテテイン基：
【化９】



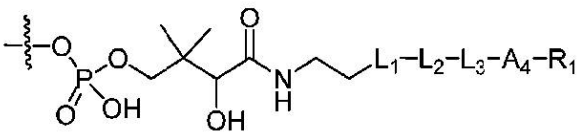
式（Ｄ－ａ）



式（Ｅ－ａ）



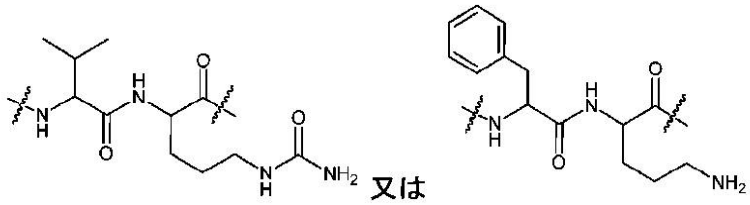
式（Ｆ－ａ）



式（Ｇ－ａ）

［式中、
L_1は、－A_1X^2－または－X^2－であり、
L_2は、結合、－A_2－、または－A_2X^2－であり、
L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、

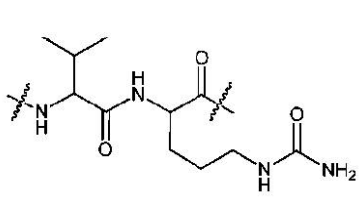
または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－であり、
Ａ$_{2}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{4}－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、
【化１０】



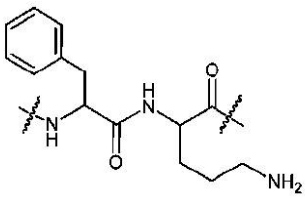
であり、
Ａ$_{3}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ

$_2$）$_n$）$_m$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、

【化１１】



又は

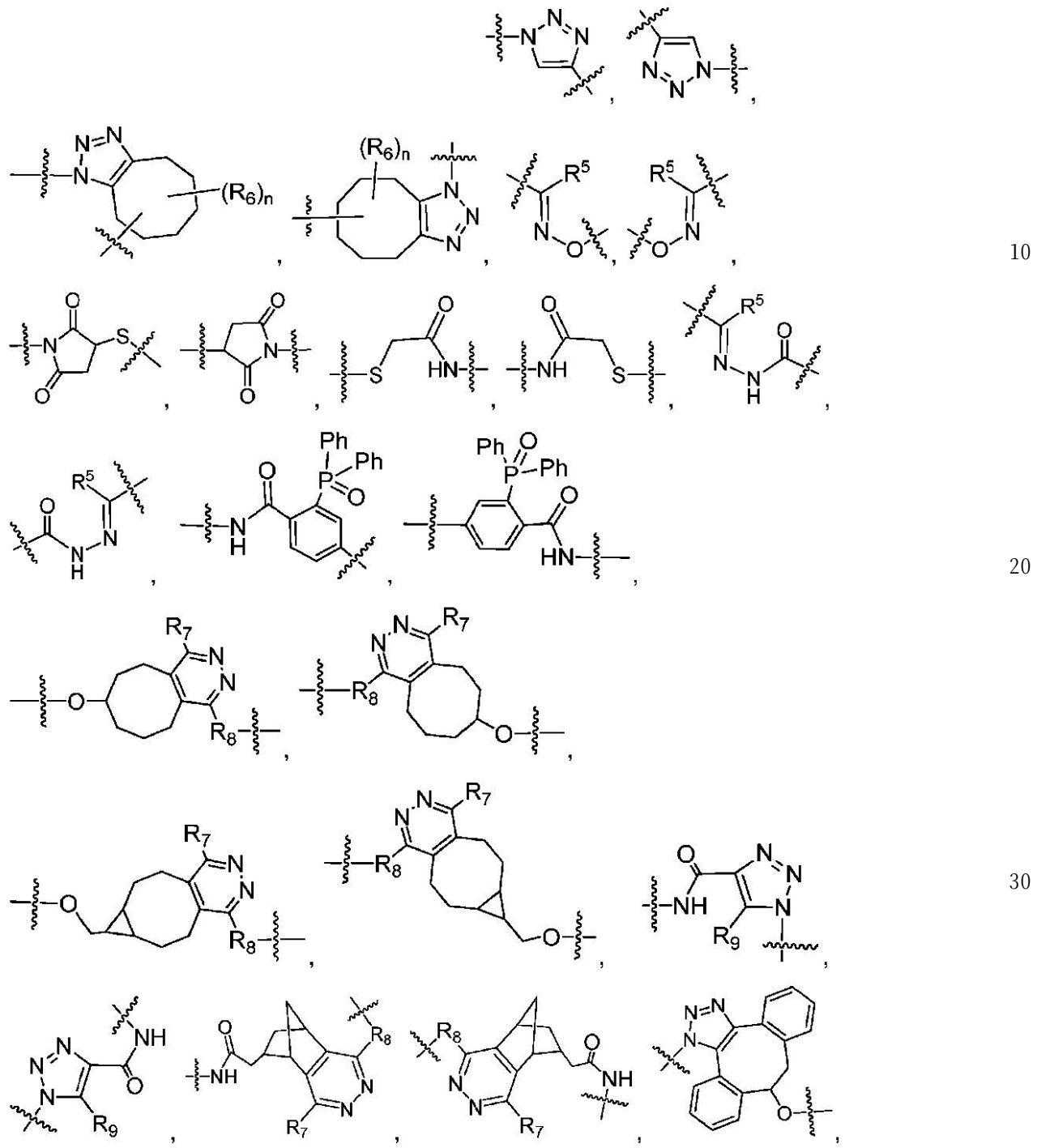


であり、

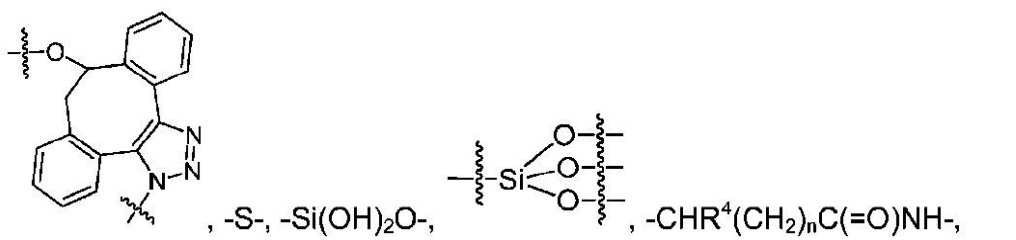
Ａ$_4$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－であり、

各Ｘ^{2}は、独立に、結合、

【化１２】

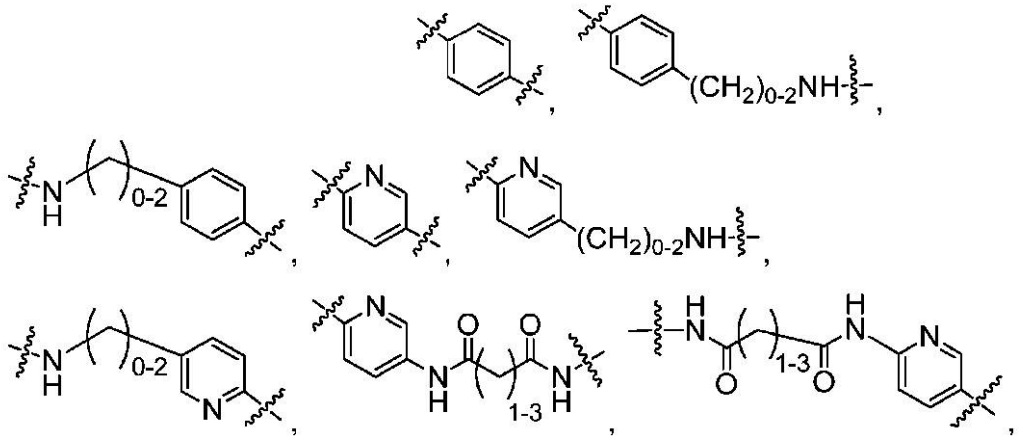


【化１３】

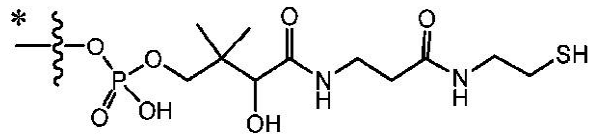


、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝

Ｏ）－から選択され、
各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、
各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、
Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、
Ｒ^{8}は、独立に、
【化１４】

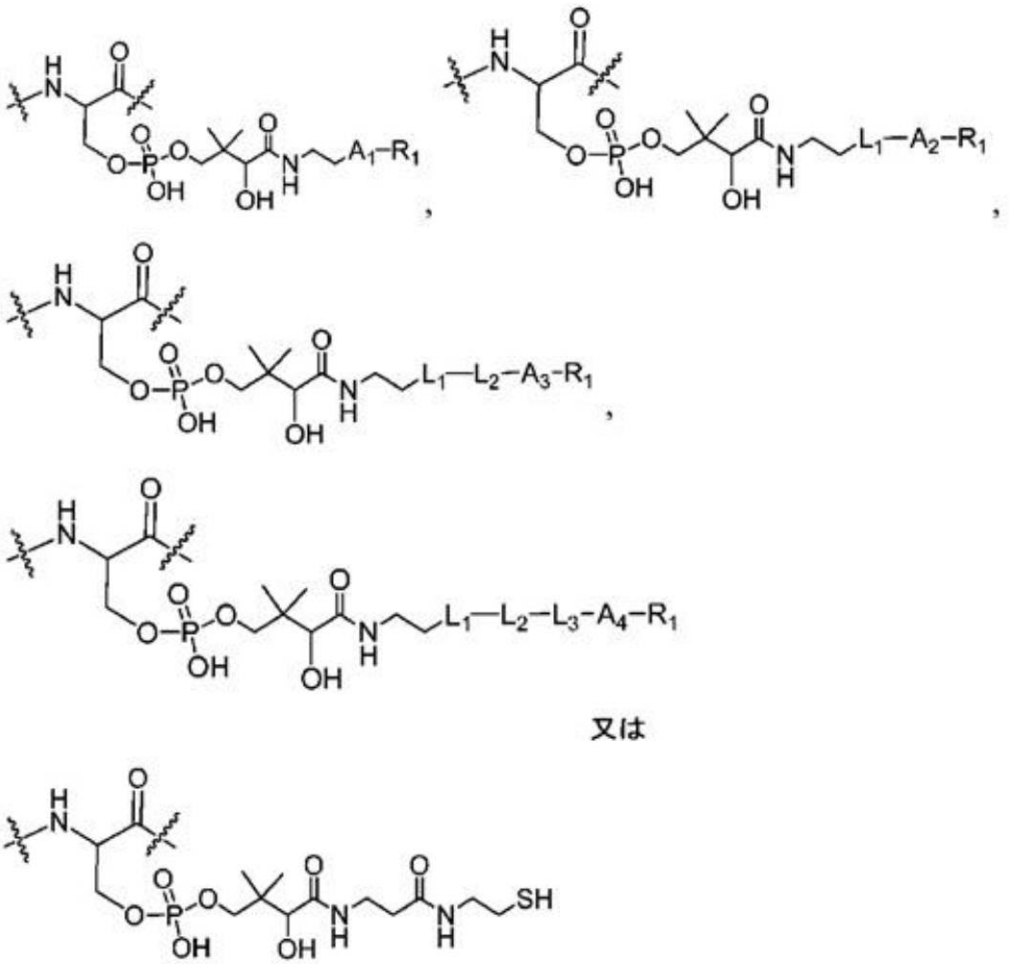


から選択され、
Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
Ｒ^{1}は、チオール、マレイミド、ハロアセトアミド、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、オキサノボルナジエン、アジド、ジアリールテトラジン、ノルボルネン、モノアリールテトラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、ＮＨ$_{2}$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルデヒド、またはケトンである］とコンジュゲートしている、請求項１から５のいずれかに記載の修飾抗体または抗原結合断片を含む免疫コンジュゲート。
【請求項１９】
４’－ホスホパンテテイン基が、
【化１５】



である、請求項１８に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２０】
コンジュゲートセリンが、

【化１６】

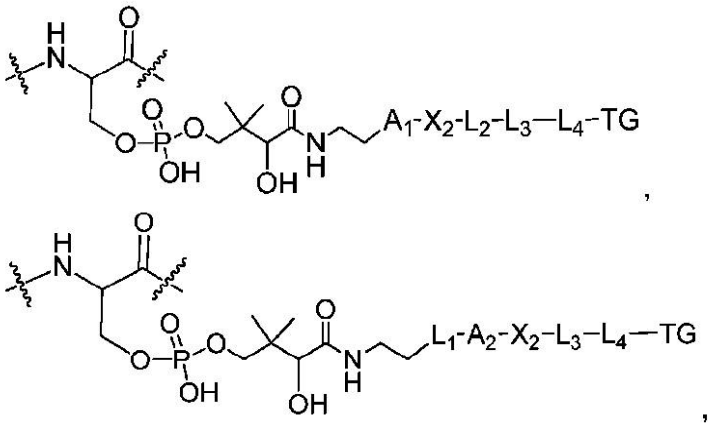


から選択される構造を有する、請求項１９に記載の免疫コンジュゲート。

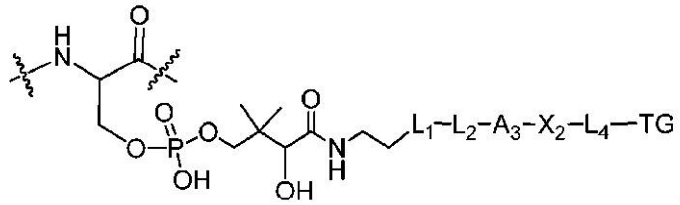
【請求項２１】

前記修飾抗体または抗体断片中のペプチドタグのセリン残基が、修飾４’－ホスホパンテテイン基とコンジュゲートしており、

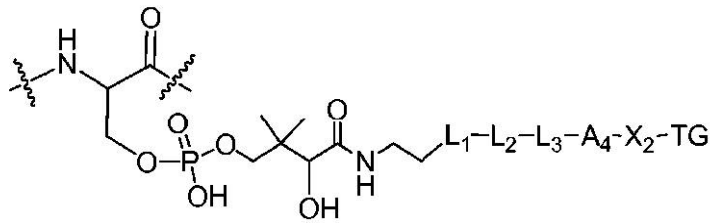
【化１７－１】



【化１７－２】

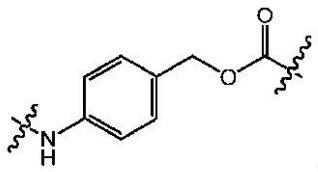
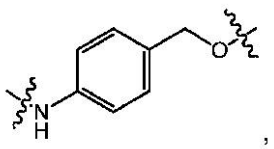
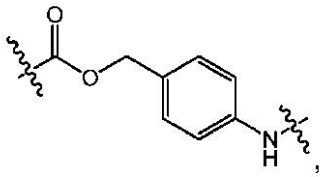
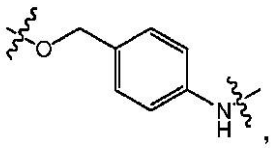
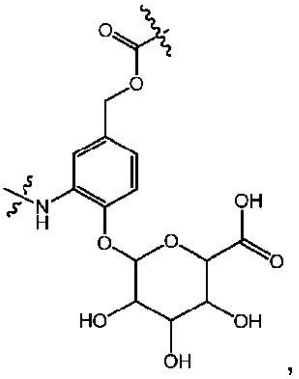
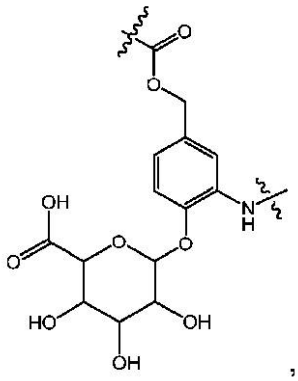
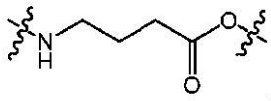
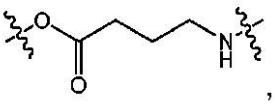


，及び

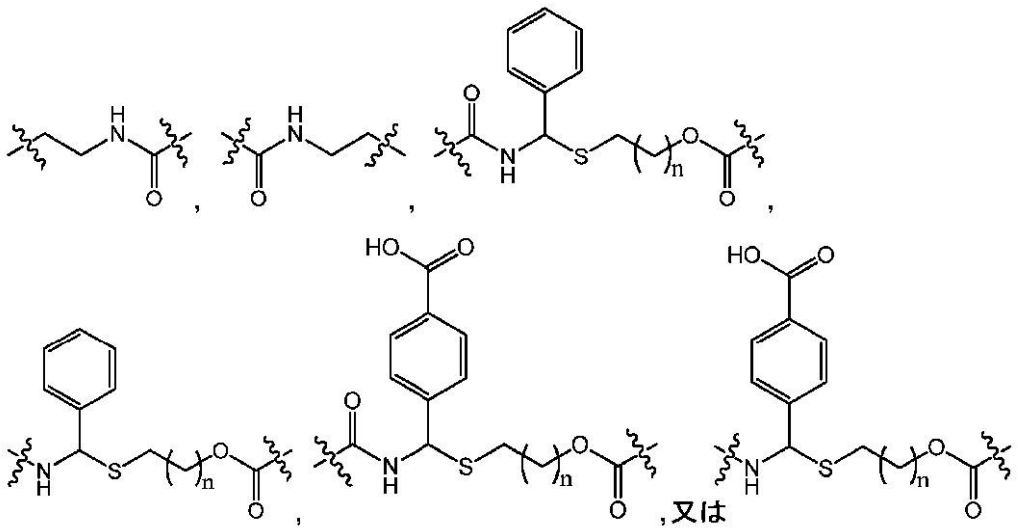


［式中、
Ｌ$_{1}$は、－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－または－Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{2}$は、結合、－Ａ$_{2}$－、または－Ａ$_{2}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{3}$は、結合、－Ａ$_{3}$－、または－Ａ$_{3}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{4}$は、結合－Ａ$_{4}$－、－Ａ$_{4}$Ｘ^{2}－、

【化１８－１】


，

，

，

，

，

，

，

，

【化１８－２】



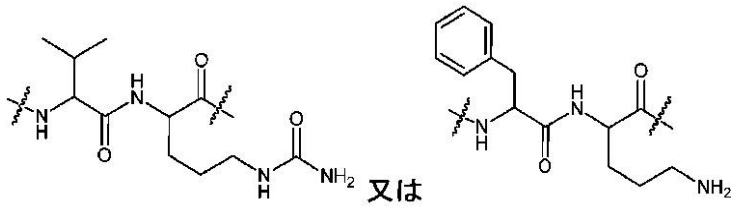
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$(O(C(R^4)_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nS$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nS$－、－Ｓ$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC$（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_mNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、または－$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC$（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$(O(C(R^4)_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＲ^4－、－$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nS$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nS$－、－Ｓ$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(CH_2)_nS$－、－$(C(R^4)_2)_nS$－、－Ｓ$(CH_2)_n$－、－Ｓ$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nNH$－、－$(C(R^4)_2)_nNH$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$

－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、

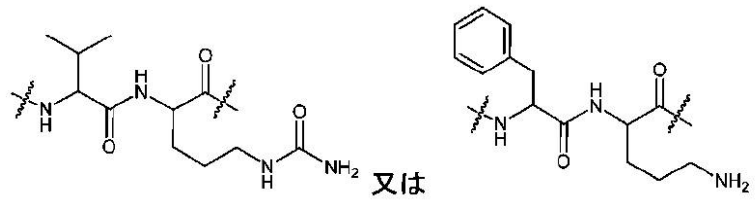
【化１９】



であり、

Ａ$_{3}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、

【化２０】



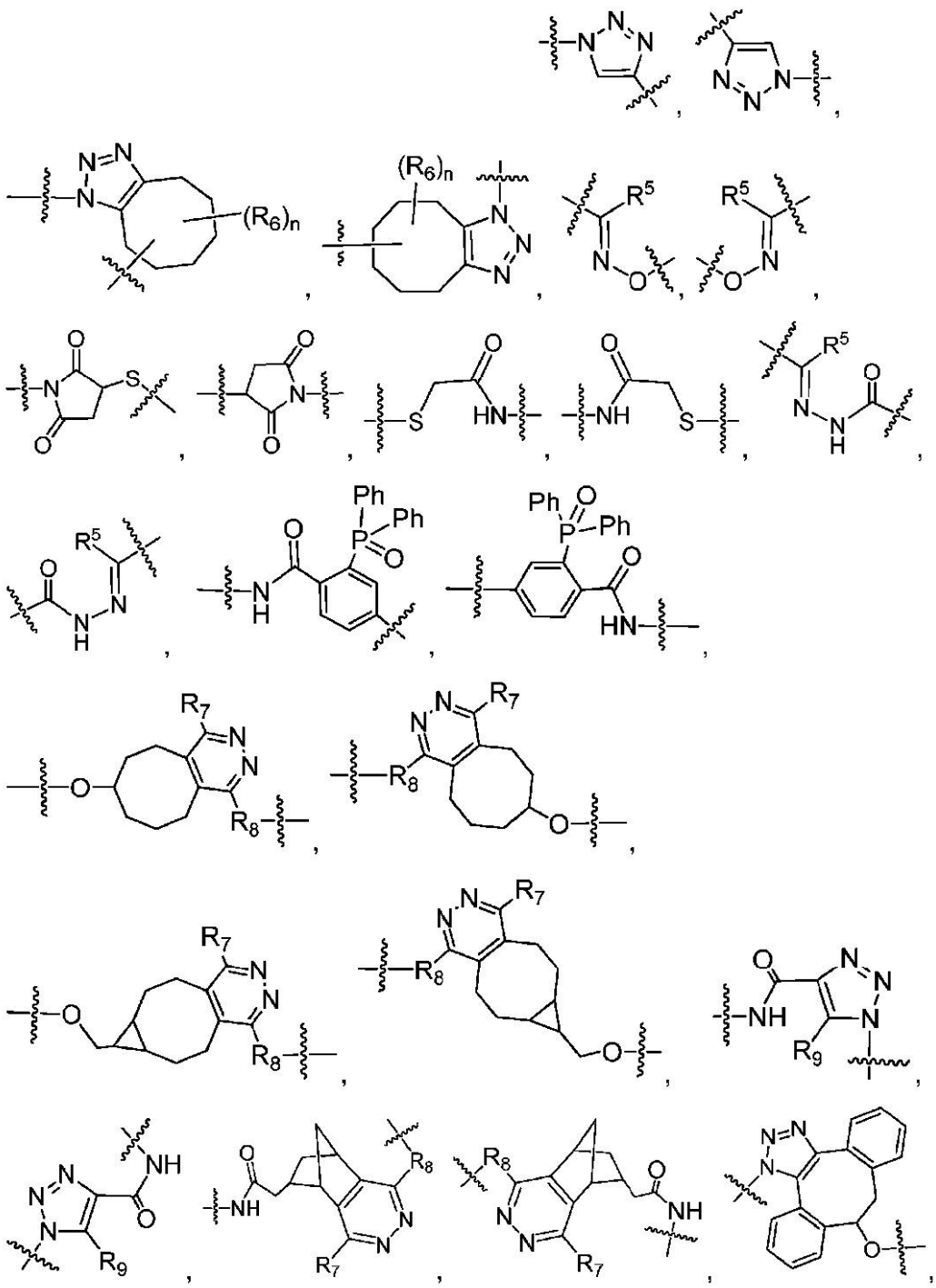
であり、

Ａ$_{4}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（

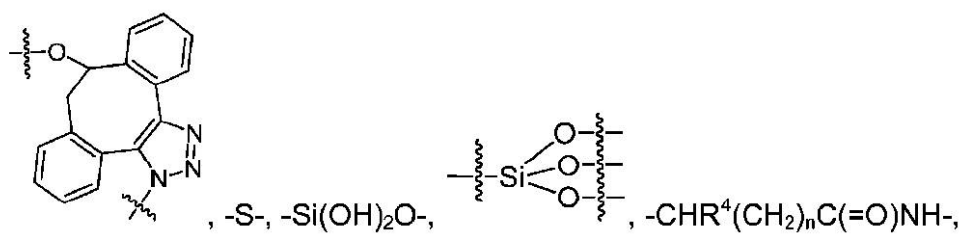
$C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、または$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$であり、

各X^2は、独立に、結合、

【化２１】



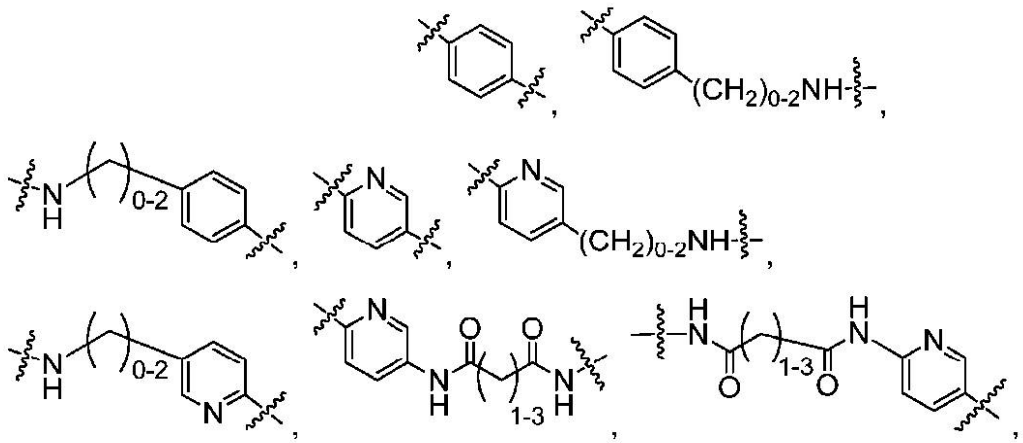
【化２２】



、-S-, -Si(OH)$_2$O-, , -CHR^4(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,

、－ＣＨＲ^4（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各R^4は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、－C（＝O）OH、および－OHから選択され、
各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－OH基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－C（＝O）OHで置換されているベンジルオキシ、－C（＝O）OHで置換されているベンジル、－C（＝O）OHで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－C（＝O）OHで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニル、およびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、
【化２３】



から選択され、
R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
ＴＧは、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、アセチル基、または表面である］から選択される構造を有する、請求項１から５のいずれかに記載の修飾抗体または抗原結合断片を含む免疫コンジュゲート。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットでＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれている配列表を含む。２０１３年５月２９日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、ＰＡＴ０５５１４２＿ＳＬ＿２．ｔｘｔとの名称を有し、そのサイズは１，８００，６９１バイトである。
【０００２】
本発明は、部位特異的標識プロセスおよびそれによって生成される分子に関する。
【背景技術】
【０００３】
コンジュゲーションは、タンパク質療法、抗体薬物コンジュゲート（antibody drug conjugate；ＡＤＣ）、ワクチン、組織選択的標的化ビヒクル、分子診断法、およびタンパク質核酸コンジュゲートなど、生物学的に活性なタンパク質の特性を最適化するために幅広く使用されている。伝統的なコンジュゲーション方法では、リシンをベースとした共有

結合的ライゲーションを利用するが、このことによって、タンパク質の表面上にはリシンが多くあるので、均一性を達成することが困難になっている。

【０００４】

タンパク質の部位特異的標識は、例えば、標識をタンパク質に共有結合させるためにヒトＯ^{6}－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキル－トランスフェラーゼ（ＡＧＴ）、ビオチンリガーゼ、トランスグルタミナーゼ、ソルターゼ、クチナーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用する翻訳後酵素反応によって達成することができる。

【０００５】

ヒトＯ^{6}－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキル－トランスフェラーゼを使用する翻訳後酵素反応では、ＡＧＴを、対象とする標的タンパク質に融合させ、続いて、ＡＧＴのための自殺基質である標識されたＯ^{6}－ベンジルグアニンを付加する（Keppleretら、Nat. Biotechnol. 21:86～89、2003）。この手法は、ＳＮＡＰ－ｔａｇ（商標）と呼ばれる技術の基礎となっており、１８０アミノ酸タグを利用する（Tiratら、International Journal of Biological Macromolecules、39:66～76、2006）。しかしながら、この手法を使用するタンパク質の標識は、Ｃ末端またはＮ末端でしか起こらない。

【０００６】

ビオチンライゲーションでは、酵素ビオチンタンパク質リガーゼ（ＢＰＬ）は、ビオチンをある特定のカルボキシラーゼまたはデカルボキシラーゼのビオチンキャリヤードメインに結合させる。ＢＰＬは２ステップで、アデノシン－５’－三リン酸（ＡＴＰ）依存性反応である、ビオチンのカルボキシル基と、ビオチンキャリヤードメイン内の高度保存Ａｌａ－Ｍｅｔ－Ｌｙｓ－Ｍｅｔ（配列番号１０１７）認識設置モチーフ内に設置されている特異的リシン残基のε－アミノ基との間でのアミド結合の翻訳後形成を触媒する（Tiratら、International Journal of Biological Macromolecules、39:66～76、2006）。この手法は、Ｃ末端に、Ｎ末端に、またはさらには標的タンパク質内に融合タグを創製するために使用することができ、ＢｉｏＥａｓｅ（商標）（７２アミノ酸タグ）およびＡｖｉＴａｇ（商標）（ビオチンリガーゼ、ＢｉｒＡ、および１５残基アクセプターペプチドタグ（ＡＰ）を使用）と呼ばれる技術のための基礎となっている。

【０００７】

トランスグルタミナーゼは、アンモニアの喪失を伴うグルタミン（Ｇｌｎ）およびリシン（Ｌｙｓ）の側鎖間での安定なイソペプチド結合の形成を触媒し、インビトロでタンパク質中のグルタミン側鎖をフルオロフォアで標識するために使用されている（Satoら、Biochemistry 35:13072～13080、1996）。また、細菌およびヒト組織トランスグルタミナーゼ（ＢＴＧａｓｅおよびＴＧ２）が、種々のＩｇＧの翻訳後修飾を、ＩｇＧ重鎖内に設置されているＬｙｓまたはＧｌｎ側鎖を介して触媒するために使用されている（Mindtら、Bioconjugate Chem. 19:271～278、2008; Jegerら、Angew. Chem. Int. 49:9995～9997、2010）。

【０００８】

ソルターゼは、タンパク質のＣ末端およびＮ末端部位特異的修飾のために使用されており、その場合、ソルターゼＡは、ペプチド転移反応を触媒する（Antosら、JACS、131:10800～10801、2009）。

【０００９】

クチナーゼは、加水分解に対して耐性のあるホスホナートリガンドと共に部位特異的共有付加物を形成する２２ｋＤａセリンエステラーゼである。クチナーゼは、抗体のＣ末端およびＮ末端部位特異的修飾、続く、表面上での固定化のために使用されている（Kwonら、Anal. Chem. 76:5713～5720、2004; Hodnelandら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、99:5048～5052、2002）。

【００１０】

アシルキャリヤータンパク質（ＡＣＰ）およびペプチジルキャリヤータンパク質（ＰＣＰ）の４’－ホスホパンテテイニル化は、それぞれポリケチドシンターゼ（ＰＫＳ）およ

び非リボソームペプチドシンテターゼ（ＮＲＰＳ）による代謝産物合成の活性化に必要な必須翻訳後修飾に関係している（Fischbachら、Chem. Rev. 106(8):3468～3496、2006）。ＡＣＰおよびＰＣＰのアポ型からホロ型への変換は、補酵素Ａ（ＣｏＡ）の４’－ホスホ－パンテテイニル部分をタンパク質ドメインの不変セリン残基に結合させる４’－ホスホパンテテイン（ｐｐａｎ）トランスフェラーゼによって触媒される（Lambalotら、Chem. Biol. 3(11):923～936、1996）。キャリヤータンパク質の同等に小さなサイズと、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが官能化ＣｏＡ類似体を基質として許容する能力とによって、研究者らはキャリヤータンパク質を、標的タンパク質を様々な小分子プローブで標識するための融合タグとして使用している（例えば、La Clairら、Chem. Biol. 11(2):195～201、2004; Yinら、J. Am. Chem. Soc. 126(25):7754～7755、2004を参照されたい）。キャリヤータンパク質タグのサイズをさらに縮小する努力において、Walshおよび共同研究者らは、ファージディスプレイを使用して、細菌４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼＳｆｐ（サーファクチン産生（surfactin production）を担う遺伝子座位として以前に同定された）およびＡｃｐＳによって有効な基質として認識される８～１２残基ペプチドを同定した（Yinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(44):15815～15820, 2005; Zhouら、ACS Chem. Biol. 2(5):337～346、2007; Zhouら、J. Am. Chem. Soc. 130(30):9925～9930、2008）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、細胞傷害性薬を局所送達するために癌の治療において使用されている（例えば、Lambert、Curr. Opinion In Pharmacology 5:543～549、2005を参照されたい）。ＡＤＣは、薬物部分の標的化送達を可能とし、その際、最小限の毒性で最大の有効性を達成することができる。さらに多くのＡＤＣが有望な臨床結果を示しているので、様々な薬剤とのコンジュゲーションを可能にする、特に、癌療法において使用するために規定の薬物対抗体比を有する均一な免疫コンジュゲートを生成することができる部位特異的コンジュゲーションを可能にする反応性基を提供する安定な操作された抗体を開発する必要性が高まっている。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、かつ抗体または抗体断片の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含む修飾抗体またはその断片を提供する。本発明はさらに、そのような修飾抗体または抗体断片と、末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供する。本発明はまた、そのような修飾抗体、抗体断片、および免疫コンジュゲートを作製する方法、さらには、そのような組成物を使用する方法を提供する。

【００１３】

一部の実施形態では、本発明は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、かつ抗体または抗体断片の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含み、その際、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼがＳｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体もしくは相同体型である、修飾抗体またはその断片を提供する。一部の実施形態では、ペプチドタグは、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＣＬＮ（配列番号３）、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＣＬＮ（配列番号４）、ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＬＬＮ（配列番号５）、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＳＬＮ（配列番号６）、ＧＳＱＤＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号７）、ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、Ｇ

ＤＳＬＤＭ（配列番号１５）、ＬＤＳＶＲＭＭＡＬＡＡＲ（配列番号１６）、ＬＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＲ（配列番号１７）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）、ＤＶＬＤＳＬＥＦＩ（配列番号２０）、ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳ（配列番号２１）およびＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）からなる群から選択される。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１４】

一部の実施形態では、本発明は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、かつ抗体またはその断片のＶＨ、ＶＬ、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはC_L領域の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含む修飾抗体またはその断片を提供する。一部の実施形態では、ペプチドタグは、表１に列挙されている任意の２個のアミノ酸の間に挿入されている。一部の実施形態では、本発明は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、かつ抗体またはその断片のＣＨ１領域の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含む修飾抗体または抗体断片を提供する。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１５】

一部の実施形態では、ペプチドタグは、親抗体またはその断片のV_HまたはV_Lドメインのアミノ酸残基２および３の間に、またはV_Hドメインのアミノ酸残基６３および６４の間に、またはV_Hドメインの６４および６５の間に、またはＣＨ１ドメインの１３８および１３９の間に、またはＣＨ１ドメインの１９７および１９８の間に、またはＣＨ３ドメインの３５９および３６０の間に、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間に、またはＣＨ３ドメインの４４７の後に挿入されている。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１６】

一部の実施形態では、ペプチドタグは、親抗体またはその断片のＶＨまたはＶＬドメインのアミノ酸残基２および３の間に、または軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間に、またはＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６２および１６３の間、もしくは１６４および１６５の間、もしくは１６５および１６６の間、もしくは１９４および１９５の間、もしくは１９５および１９６の間に、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間、もしくは４４５および４４６の間、もしくは４４６および４４７の間に挿入されている。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１７】

一部の実施形態では、ペプチドタグは、親抗体またはその断片の軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間に、ＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６２および１６３の間、もしくは１６４および１６５の間、もしくは１６５および１６６の間、もしくは１９４および１９５の間、もしくは１９５および１９６の間に、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間に挿入されている。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１８】

一部の実施形態では、ペプチドタグは、V_Hドメインのアミノ酸残基６２～６４もしくは６２～６５の間に、またはＣＨ１ドメインのアミノ酸残基１３３～１３８の間に、またはＣＨ１ドメインの１８９～１９５の間に、またはＣＨ１ドメインの１９０～１９７の間にグラフトされている。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１９】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、および／または配列番号１４１を含む修飾抗体または抗体断片を提供する。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００２０】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号２６、配列番号２７、配列番号３２、配列番号６３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３９、配列番号１４９、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６６、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号２４８、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６５、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５６、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７１、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８１、配列番号３８４、配列番号３８６、配列番号３８７、または配列番号３８８を含む修飾抗体または抗体断片を提供する。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００２１】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号３２、配列番号６３、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３２、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６６、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６５、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７１、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８１、または配列番号３８４を含む修飾抗体または抗体断片を提供する。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００２２】

一実施形態では、本発明は、Ｓｆｐの基質であり、かつ抗体または抗体断片の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含み、その際、そのペプチドタグが、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＣＬＮ（配列番号３）、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＣＬＮ（配列番号４）、ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＬＬＮ（配列番号５）、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＳＬＮ（配列番号６）、ＧＳＱＤＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号７）、ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、ＬＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＲ（配列番号１７）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）、またはＤＳＬＥＦＩＡＳ（配列番号１１１６）である修飾抗体またはその断片を提供する。別の実施形態では、ペプチドタグは、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）、またはＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）である。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００２３】

一部の実施形態では、本発明の修飾抗体または抗体断片は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、およびＩｇＡから選択されるアイソタイプである。一部の他の実施形態では、本発明の修

飾抗体または抗体断片は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４から選択されるＩｇＧのサブタイプである。一部の実施形態では、本発明の修飾抗体または抗体断片は、ヒトもしくはヒト化抗体または抗体断片である。具体的な実施形態では、本発明の修飾抗体または抗体断片は、抗ＨＥＲ２抗体または抗ＨＥＲ２抗体断片である。本発明はさらに、そのような修飾抗体またはその断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００２４】

本発明は、本明細書に記載の修飾抗体または抗体断片をコードする核酸、およびそのような核酸を含む宿主細胞を提供する。

【００２５】

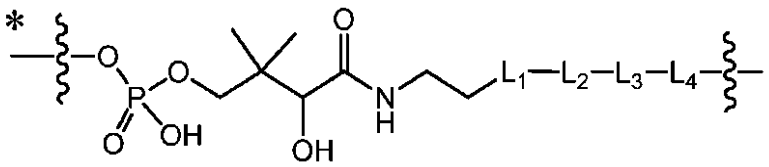
本発明は、修飾抗体またはその断片と、末端基とを含み、その際、修飾抗体または抗体断片が４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、かつ抗体または抗体断片の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含む免疫コンジュゲートを提供する。一部の実施形態では、この修飾抗体または抗体断片は、１個または複数の直交性コンジュゲーション部位をさらに含む。具体的な実施形態では、各直交性コンジュゲーション部位は、独立に、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質、ＡｃｐＳ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、ホルミルグリシン、非天然アミノ酸、ピロリシン、およびピロリン－カルボキシリシンから選択される。

【００２６】

本明細書において提供する別の態様は、修飾抗体または抗体断片と、修飾抗体または抗体断片中のペプチドタグに結合している末端基（ＴＧ）とを、式（Ｉ－ｂ）による構造を有するリンカー：

【００２７】

【化１】



式(I－b)

［式中、

L_1は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_2は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_3は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_4は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーであり、

＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合している場所を示す］によって結合しており、

末端基は、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬（imaging reagent）、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、アセチル基、または表面である

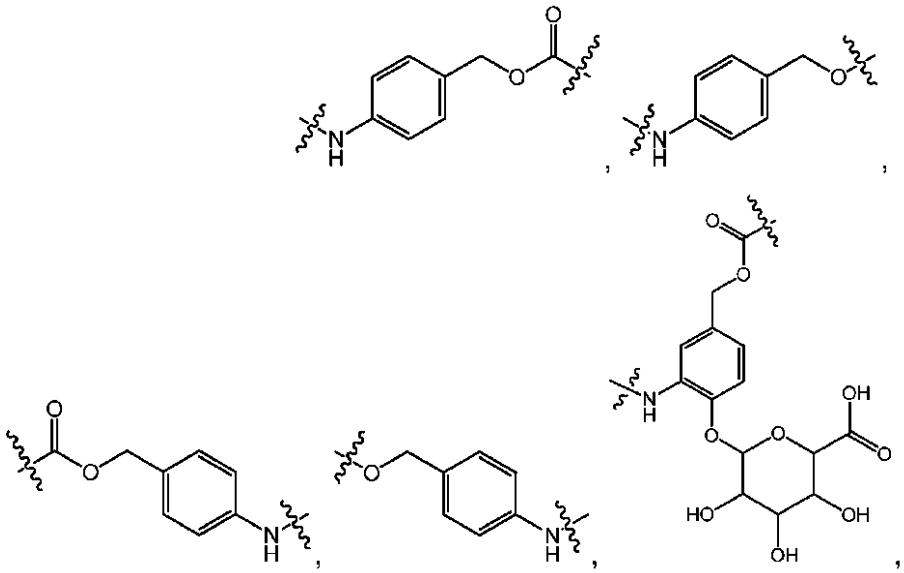
、免疫コンジュゲートである。

【００２８】

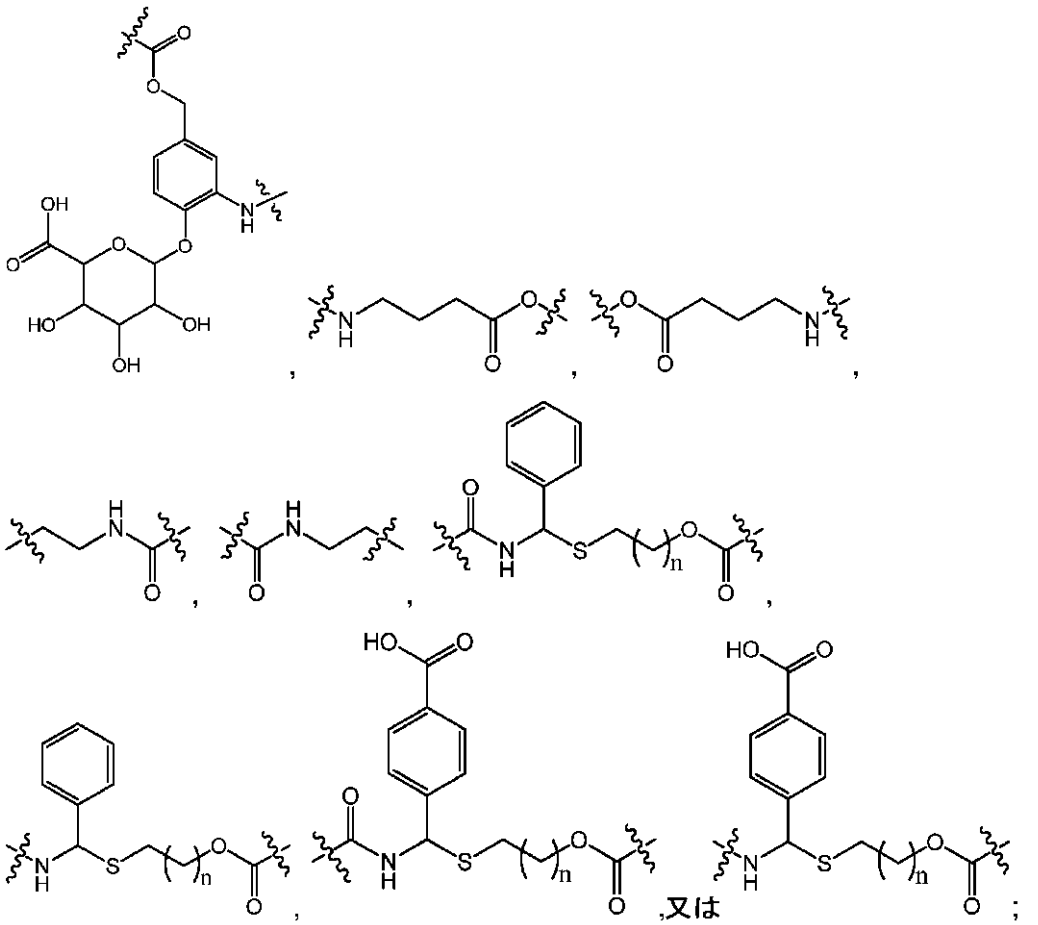
そのような免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、

L_1は、$-A_1X^2-$または$-X^2-$であり、L_2は、結合、$-A_2-$、または$-A_2$

X^2－であり、
L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、
L_4は、結合、－A_4－、－A_4X^2－、
【００２９】
【化２－１】



【化２－２】



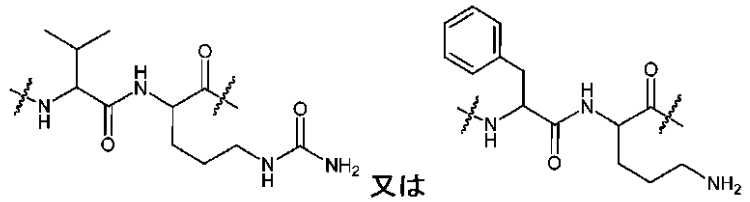
であり、
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）

$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

A_2は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NR^4－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$S－、－（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【００３０】

【化３】



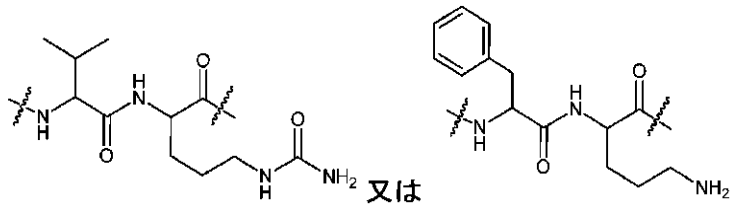
であり、

A_3は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝

O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH$_2$）$_n$S－、－（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH$_2$）$_n$－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【００３１】

【化４】



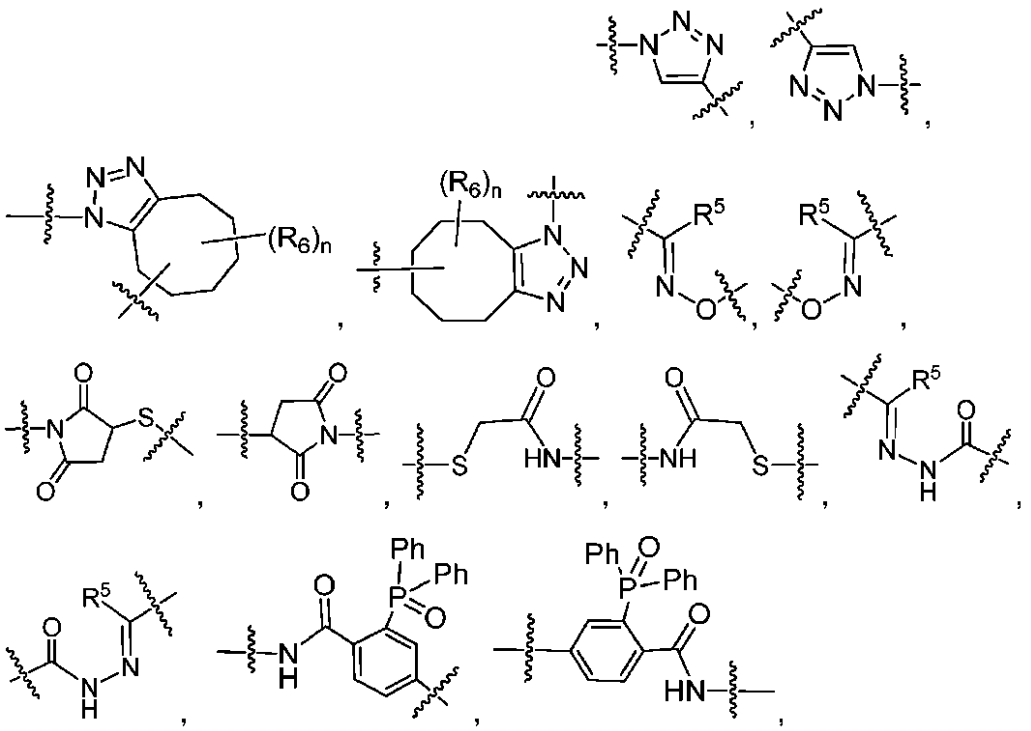
であり、

A$_4$は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH$_2$）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH$_2$）$_n$O）$_m$（CH$_2$）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$NH（（CH$_2$）$_n$O）$_m$（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^{2}は、独立に、結合、

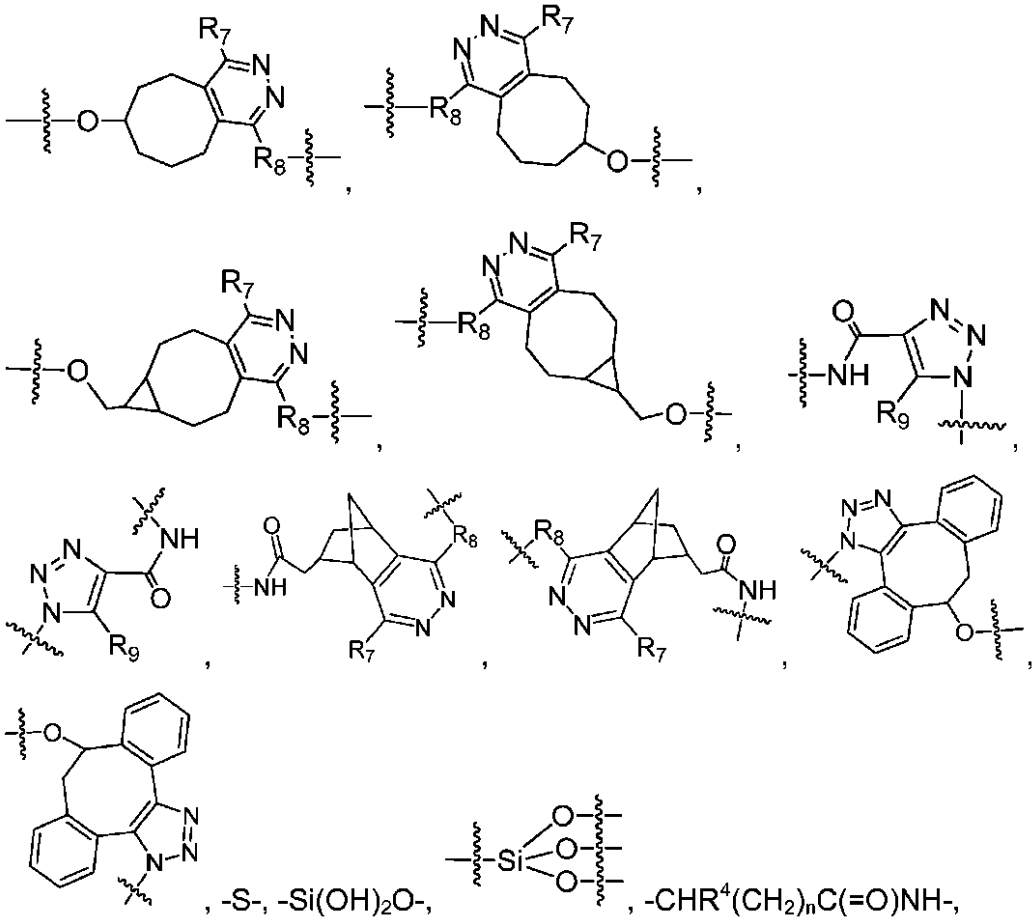
【００３２】

【化５】



【００３３】

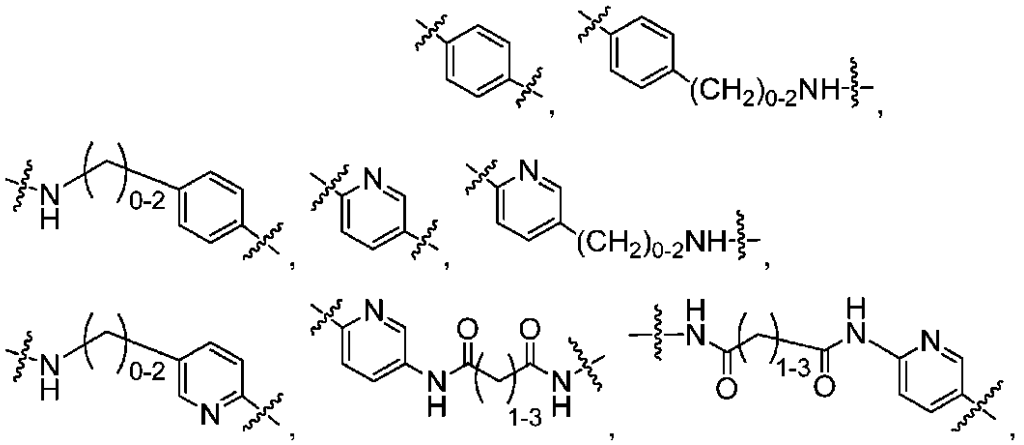
【化６】



、-S-, -Si(OH)$_2$O-, , -CHR^4(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-、－ＣＨＲ^4（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

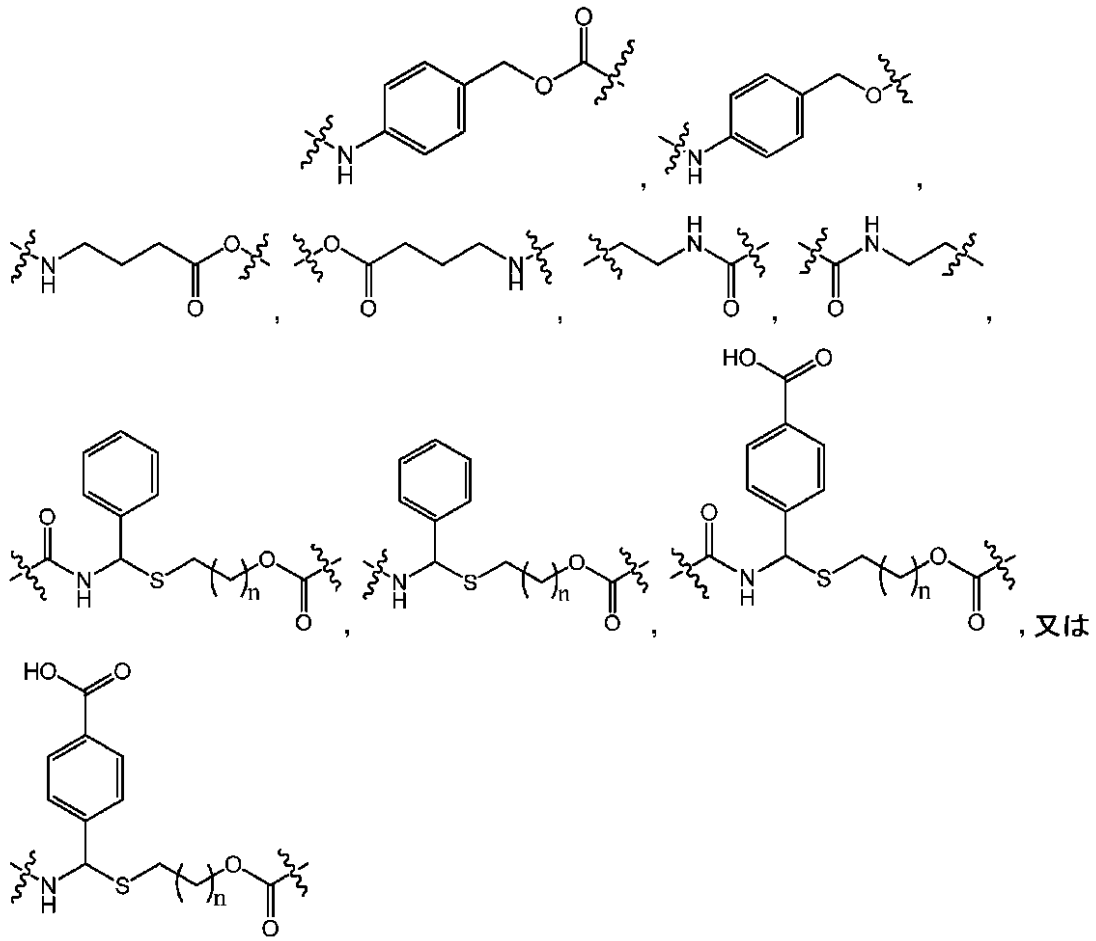
各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニルおよびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、
【００３４】
【化７】



から選択され、
R^9は、独立に、Hおよび$C_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。
【００３５】
そのような免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は、－A_1X^2－または－X^2－であり、
L_2は、結合、－A_2－、または－A_2X^2－であり、
L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、
L_4は、結合、－A_4－、－A_4X^2－、
【００３６】

【化８】



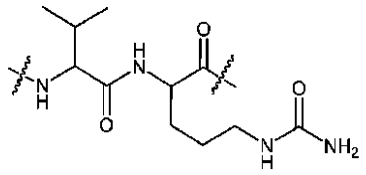
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－または－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－または

【００３７】

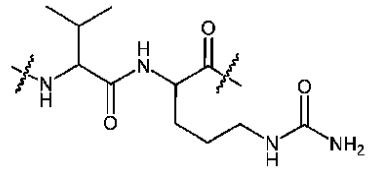
【化９】



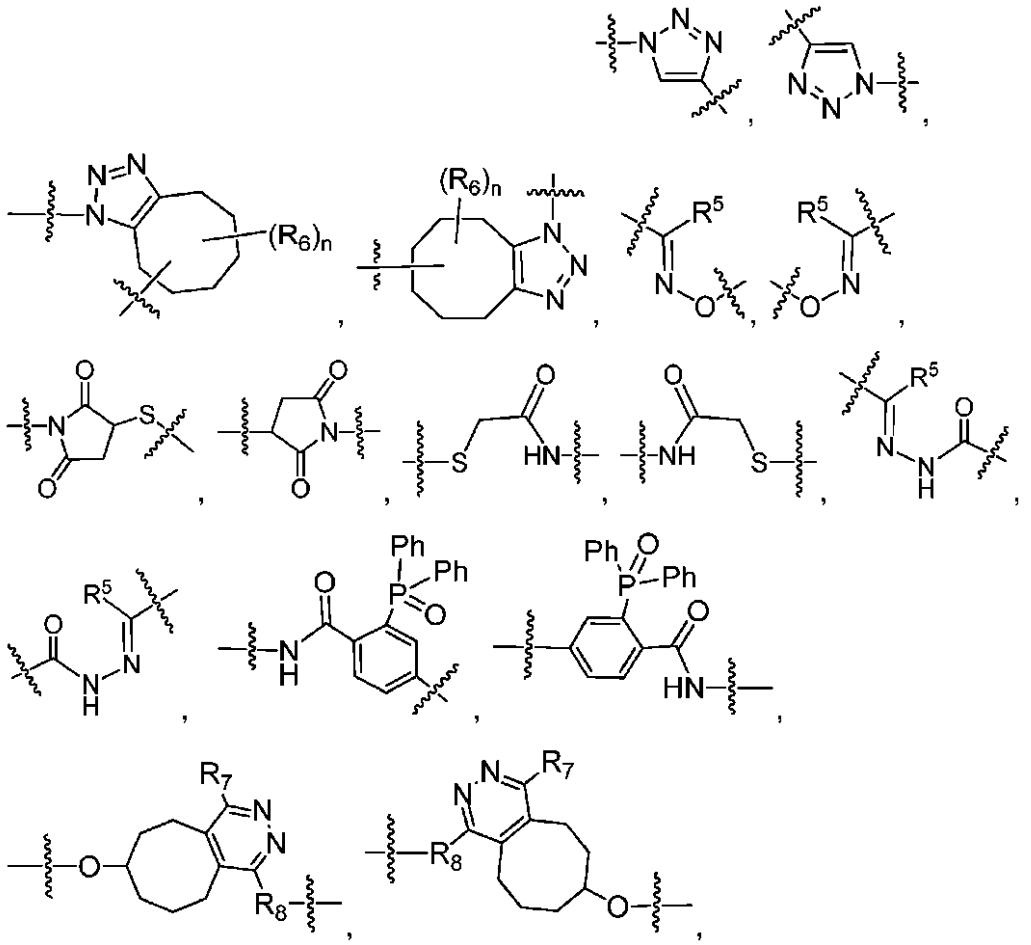
であり、

A_3は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－または

【００３８】
【化１０】

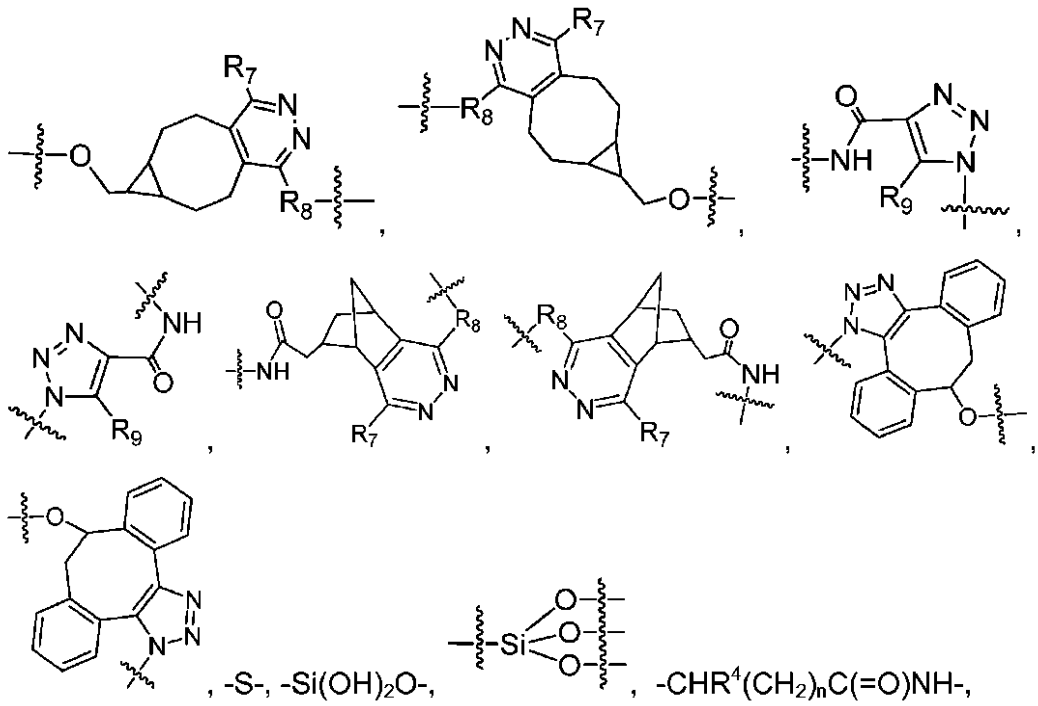


であり、
Ａ$_4$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－または－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、
各Ｘ^{2}は、独立に、結合、
【００３９】
【化１１】



【００４０】

【化１２】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

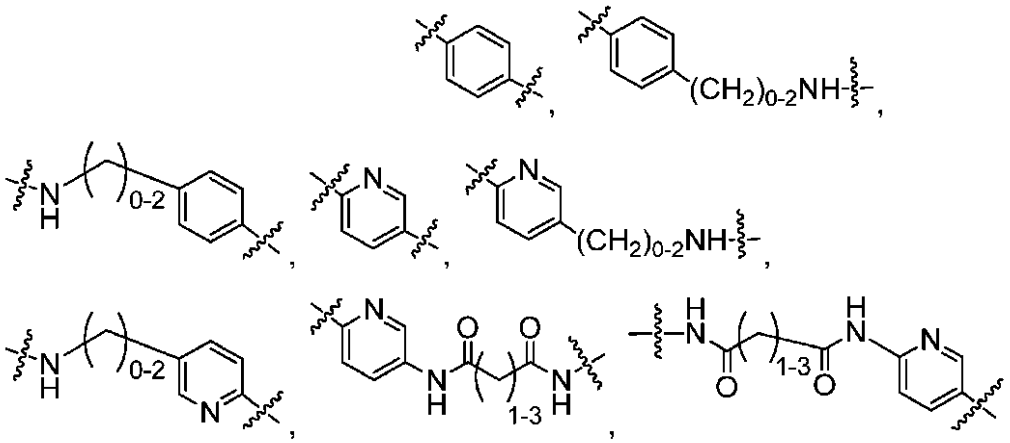
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニルおよびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【００４１】

【化１３】



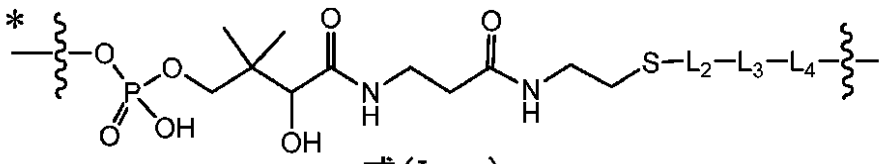
から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

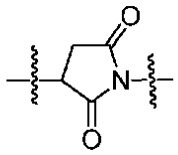
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。

【００４２】
そのような上述の免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、式（Ｉ－ｂ）のリンカーは、式（Ｉ－ｃ）による構造を有するリンカー：
【００４３】
【化１４】

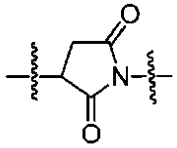


式(I－c)

である。
【００４４】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は、－A_1X^2－であり、この際、A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は、
【００４５】
【化１５】

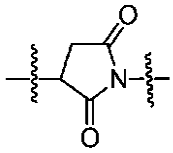


であり、
L_2は、結合であり、L_3は結合であり、L_4は、－A_4－であり、この際、A_4は－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－である。
【００４６】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は、
【００４７】
【化１６】

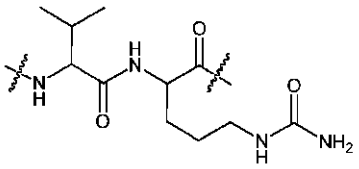


であり、
L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、この際、A_4は、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－である。
【００４８】
そのような免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は
【００４９】

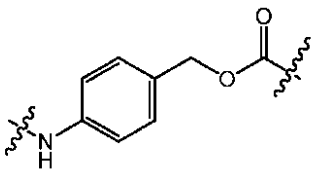
【化１７】



であり、
L_2は－A_2－であり、この際、A_2は－（CH_2）$_n$C（＝Oであり、
L_3は－A_3－であり、この際、A_3は
【００５０】
【化１８】

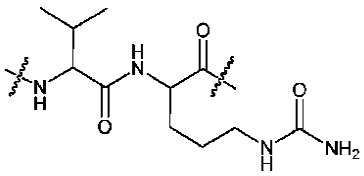


であり、
L_4は
【００５１】
【化１９】

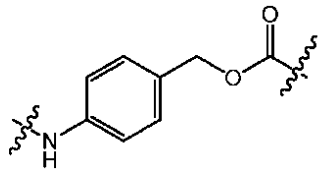


である。
【００５２】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－であり、
L_2は結合－であり、L_3は－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$C（＝O）－であり、L_4は結合である。
【００５３】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－CHR^4（CH_2）$_n$C（＝O）NH－であり、R^4は－C（＝O）OHであり、
L_2は結合であり、L_3は－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$C（＝O）－であり、L_4は結合である。
【００５４】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－（CH_2）C（＝O）NH－であり、
L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、この際、A_4は－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－である。
【００５５】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－（CH_2）C（＝O）NH－であり、
L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、この際、A_4は－（C

H_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－である。
【００５６】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、
L_2は－A_2－であり、この際、A_2は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏであり、
L_3は－A_3－であり、この際、A_3は、
【００５７】
【化２０】



であり、
L_4は、
【００５８】
【化２１】



である。
【００５９】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、
L_2は結合－であり、L_3は－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、L_4は結合である。
【００６０】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、
L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－ＣＨR^4（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、R^4は－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨであり、
L_2は結合であり、L_3は－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、L_4は結合である。
【００６１】
そのような上述の免疫コンジュゲートの他の実施形態では、末端基は、抗炎症薬、抗癌薬、抗真菌薬、抗菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、および麻酔薬から選択される薬物部分である。そのような免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、薬物部分は、Ｖ－ＡＴＰアーゼ阻害薬、ＨＳＰ９０阻害薬、ＩＡＰ阻害薬、ｍＴｏｒ阻害薬、微小管安定薬、微小管不安定化薬、オーリスタチン、ドラスタチン、マイタンシノイド、ＭｅｔＡＰ（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質ＣＲＭ１の核外輸送の阻害薬、ＤＰＰＩＶ阻害薬、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害薬、タンパク質合成阻害薬、ＣＤＫ２阻害薬、ＣＤＫ９阻害薬、Ｅｇ５阻害薬、ＨＤＡＣ阻害薬、ＤＮＡ損傷薬、ＤＮＡアルキル化薬、ＤＮＡインターカレーター、ＤＮＡ小溝結合薬、プロテアソーム阻害薬、ＲＮＡポリメラーゼ阻害薬、およびＤＨＦＲ阻害薬から選択される。そのような免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、分光学的プローブは、フルオロフォア、クロモフォア、量子ドット、磁性プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、または造影試

薬（contrast reagent）から選択される。そのような免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、アフィニティープローブはビオチンである。

【００６２】

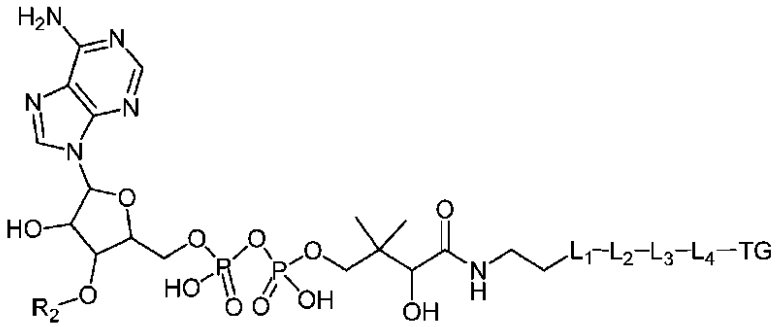
本明細書において提供する別の態様は、

（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式Ｂの構造を有する補酵素Ａ類似体：

【００６３】

【化２２】



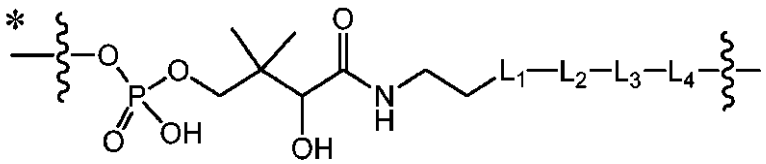
式（Ｂ）

［式中、L_1、L_2、L_3、L_4、R_2、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、末端基を、式（Ｉ－ｂ）による構造を有するリンカー：

【００６４】

【化２３】



式（Ｉ－ｂ）

［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示す］

によってペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体または抗体断片を末端基で標識するステップと

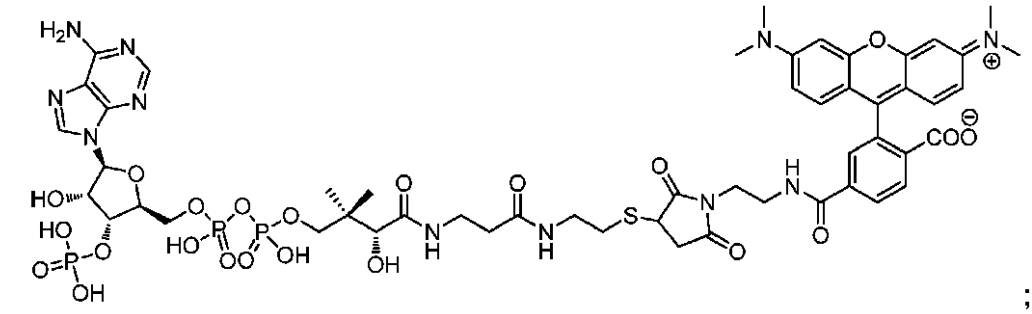
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【００６５】

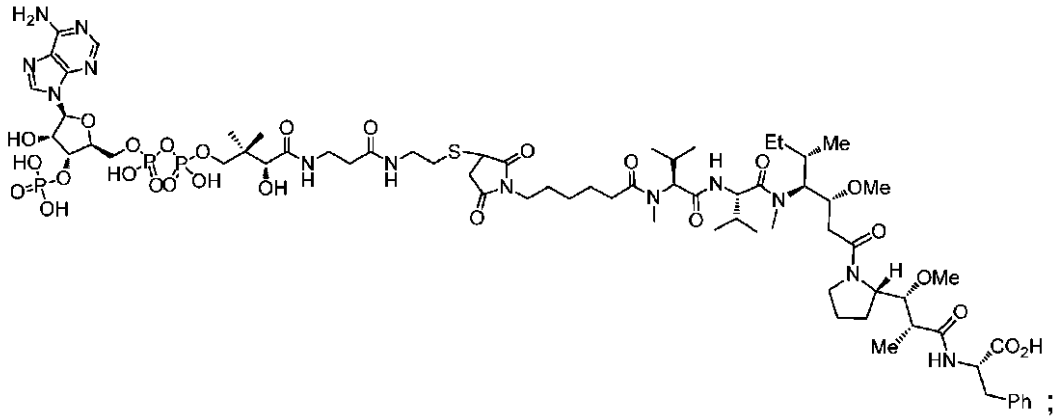
ある特定の実施形態では、式（Ｂ）の化合物は、

【００６６】

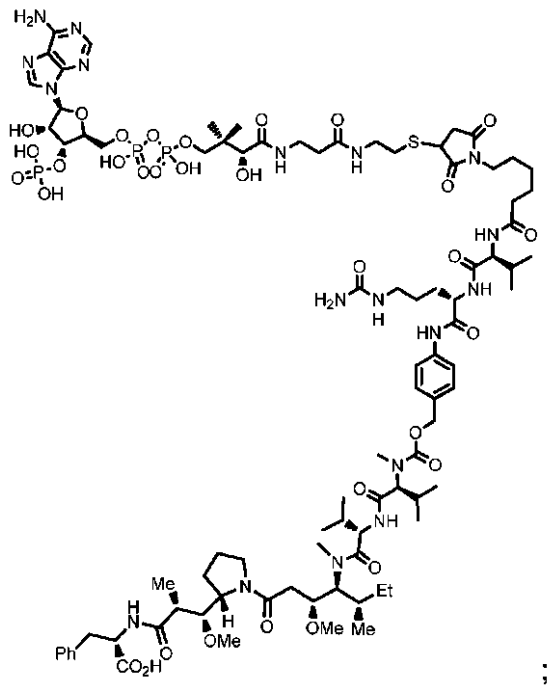
【化２４－１】



;

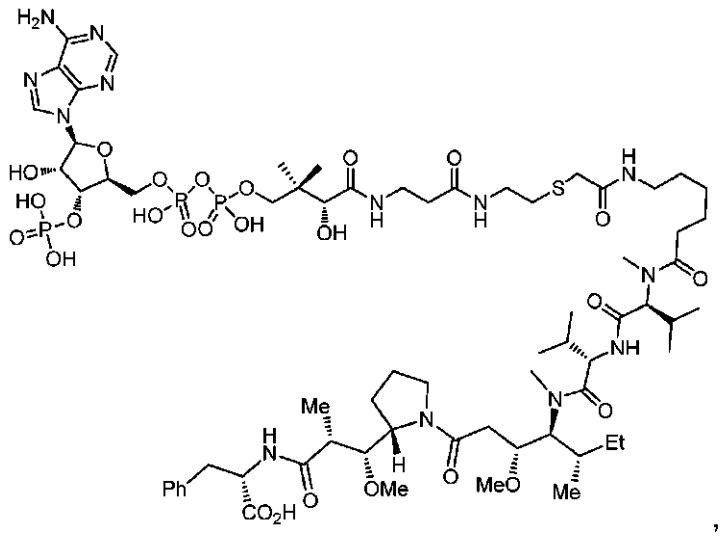


;

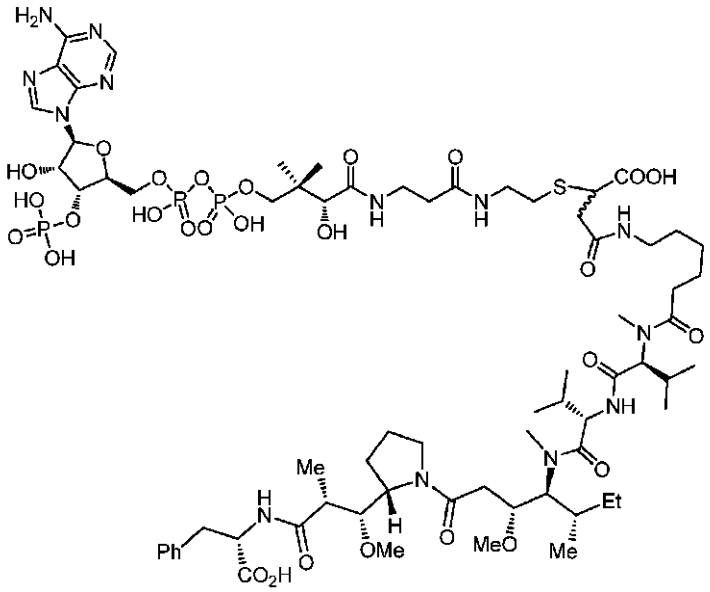


;

【化２４－２】



，及び



から選択される。

【００６７】

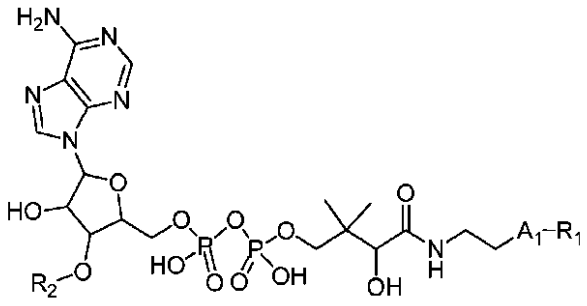
本明細書において提供する別の態様は、

（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）ｉ）式（Ｄ）の化合物：

【００６８】

【化２５】



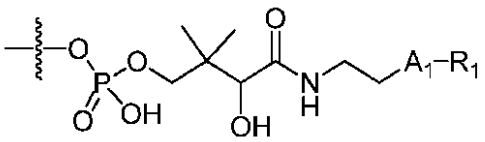
式（Ｄ）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラー

ゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、式（Ｄ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基

【００６９】

【化２６】



式（Ｄ－ａ）

［式中、Ｒ１は、官能基である］

をペプチドタグに結合させ、かつ

ｉｉ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ１を式（ＩＩ－ａ）の化合物

Ｘ－Ｌ２－Ｌ３－Ｌ４－ＴＧ

式（ＩＩ－ａ）

［式中、Ｘは、官能基Ｒ１と反応する基であり、この際、

Ｘがチオールである場合、Ｒ１は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または

Ｘがアジドである場合、Ｒ１は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエン（oxanobornadiene）であるか、または

Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがアルキンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがアルケンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ１は、ジアリールテトラジンであるか、または

Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、シクロオクテンであるか、または

Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、ノルボルネンであるか、または

Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ１は、モノアリールテトラジンであるか、または

Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または

Ｘがケトンである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－；であるか、

Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または

Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または

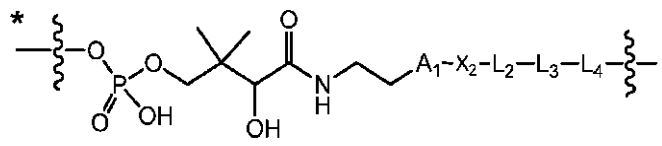
ＸがＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または

Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ１は、チオールであるか、または

Ｘがマレイミドである場合、Ｒ１は、チオールである］と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｂ）による構造を有するリンカー：

【００７０】

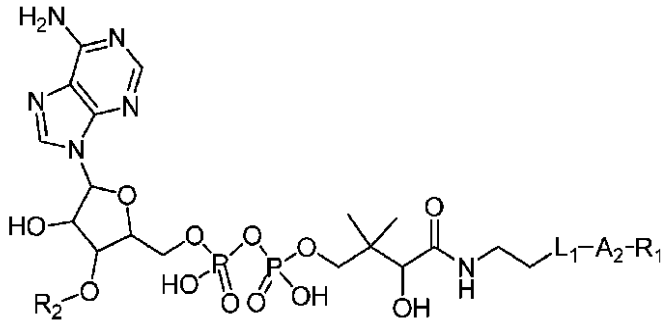
【化２７】



式（II－b）

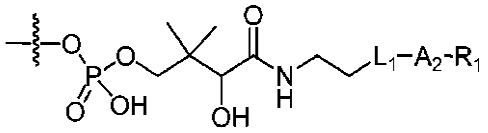
［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、Ａ１、Ｘ２、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、Ｒ２、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端

基（ＴＧ）で標識するステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。
【００７１】
本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）ｉ）式（Ｅ）の化合物：
【００７２】
【化２８】



式（Ｅ）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、式（Ｅ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基
【００７３】
【化２９】

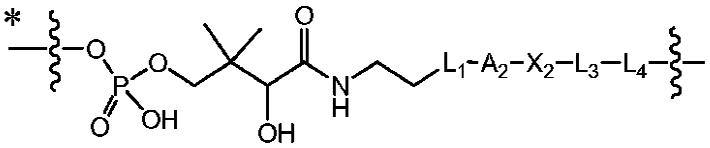


式（Ｅ－ａ）

［式中、Ｒ１は、官能基である］
をペプチドタグに結合させ、かつ
ｉｉ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ１を式（ＩＩ－ｃ）の化合物
Ｘ－Ｌ３－Ｌ４－ＴＧ
式（ＩＩ－ｃ）
［式中、Ｘは、官能基Ｒ１と反応する基であり、この際、
Ｘがチオールである場合、Ｒ１は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または
Ｘがアジドである場合、Ｒ１は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または
Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがアルキンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがアルケンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ１は、ジアリールテトラジンであるか、または
Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ１は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくは

$NH_2-NH-C(=O)-$であるか、または
Xがケトンである場合、R_1は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくは$NH_2-NH-C(=O)-$であるか、または
Xがヒドロキシルアミンである場合、R_1は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Xがヒドラジンである場合、R_1は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Xが$NH_2-NH-C(=O)-$である場合、R_1は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Xがハロアセトアミドである場合、R_1は、チオールであるか、または
Xがマレイミドである場合、R_1は、チオールである］と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｄ）による構造を有するリンカー：

【００７４】
【化３０】

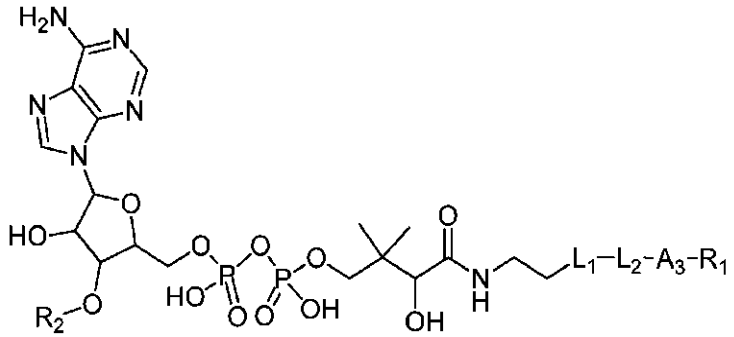


式(II－d)

［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、L_1、A_2、X_2、L_3、L_4、R_2、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【００７５】
本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）ｉ）式（Ｆ）の化合物：

【００７６】
【化３１】

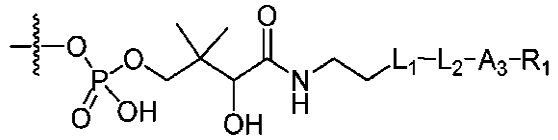


式(F)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、式（Ｆ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基

【００７７】

【化３２】

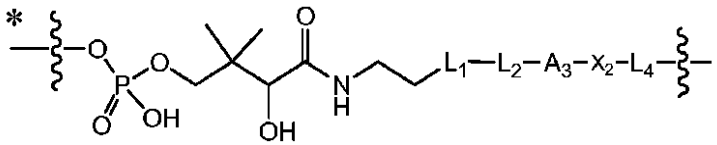


式(F－a)

［式中、Ｒ１は、官能基である］
をペプチドタグに結合させ、かつ
ｉｉ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ１を式（ＩＩ－ｅ）の化合物
Ｘ－Ｌ４－ＴＧ
式（ＩＩ－ｅ）
［式中、Ｘは、官能基Ｒ１と反応する基であり、この際、
Ｘがチオールである場合、Ｒ１は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または
Ｘがアジドである場合、Ｒ１は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または
Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがアルキンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがアルケンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ１は、ジアリールテトラジンであるか、または
Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ１は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがケトンである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
ＸがＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ１は、チオールであるか、または
Ｘがマレイミドである場合、Ｒ１は、チオールである］と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｆ）による構造を有するリンカー：

【００７８】

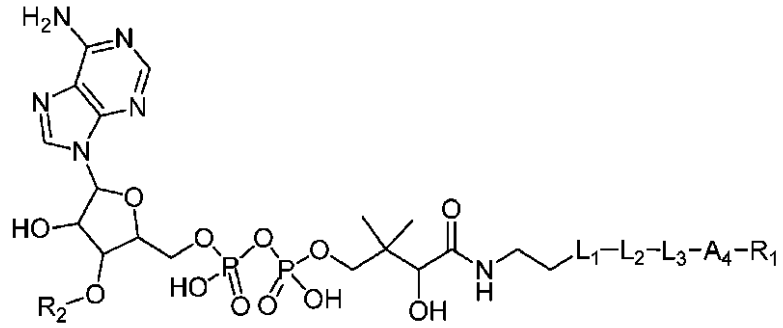
【化３３】



式(II－f)

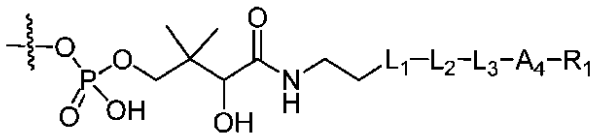
［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、Ｌ１、Ｌ２、Ａ３、Ｘ２、Ｌ４、Ｒ２、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【００７９】
本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）ｉ）式（Ｇ）の化合物：
【００８０】
【化３４】



式（Ｇ）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、式（Ｇ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基
【００８１】
【化３５】



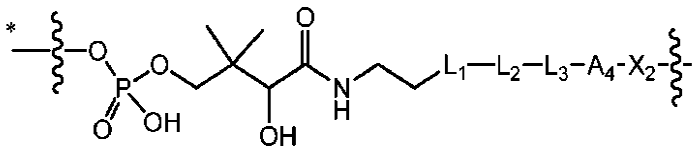
式（Ｇ－ａ）

［式中、Ｒ$_1$は、官能基である］
をペプチドタグに結合させ、かつ
ｉｉ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ$_1$を式（ＩＩ－ｇ）の化合物
Ｘ－ＴＧ
式（ＩＩ－ｇ）
［式中、Ｘは、官能基Ｒ$_1$と反応する基であり、この際、
Ｘがチオールである場合、Ｒ$_1$は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または
Ｘがアジドである場合、Ｒ$_1$は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または
Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがアルキンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがアルケンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ$_1$は、ジアリールテトラジンであるか、または
Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ$_1$は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがケトンである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ

$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
ＸがＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールであるか、または
Ｘがマレイミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールである］と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｈ）による構造を有するリンカー：

【００８２】

【化３６】



式(II－h)

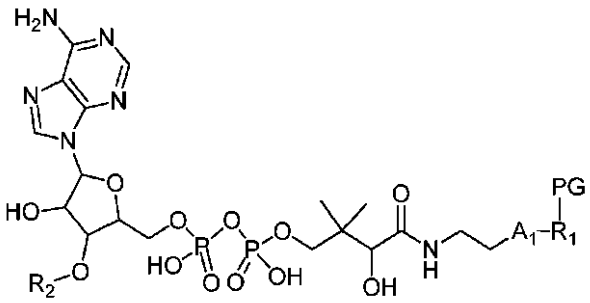
［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ａ$_4$、Ｘ$_2$、Ｒ$_2$、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【００８３】

本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）式（Ｈ）の化合物：

【００８４】

【化３７】

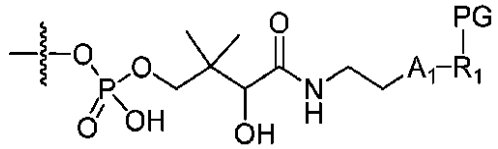


式(H)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｈ－ａ）の保護ホスホペンタチエニル基：

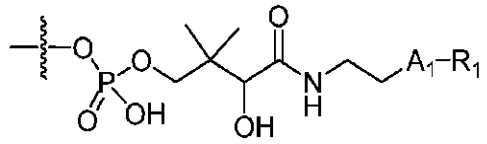
【００８５】

【化３８】



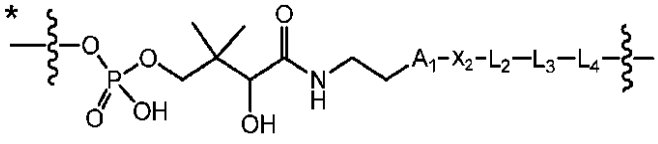
式(H－a)

［式中、Ｒ１－ＰＧは、保護官能基Ｒ１である］
をペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと、
（ｃ）保護ホスホペンタチエニル基を脱保護して、ペプチドタグに結合している式（Ｄ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基：
【００８６】
【化３９】



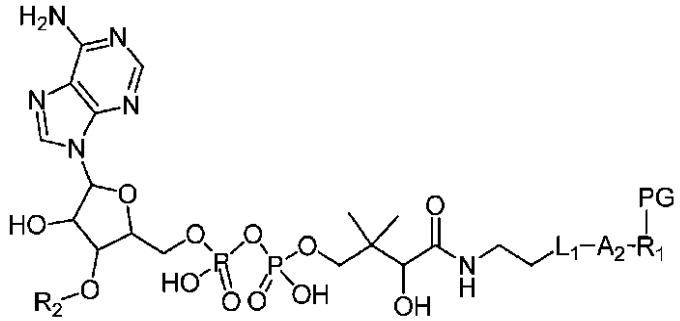
式（Ｄ－ａ）

［式中、Ｒ１は官能基である］を得るステップと、
（ｄ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ１を式（ＩＩ－ａ）の化合物
Ｘ－Ｌ２－Ｌ３－Ｌ４－ＴＧ
式（ＩＩ－ａ）
［式中、Ｘは、官能基Ｒ１と反応する基であり、この際、
Ｘがチオールである場合、Ｒ１は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または
Ｘがアジドである場合、Ｒ１は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または
Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがアルキンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがアルケンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または
Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ１は、ジアリールテトラジンであるか、または
Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ１は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ１は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがケトンである場合、Ｒ１は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
ＸがＮＨ２－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ１は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ１は、チオールであるか、または
Ｘがマレイミドである場合、Ｒ１は、チオールである］
と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｂ）による構造を有するリンカー：
【００８７】
【化４０】



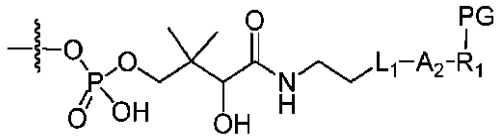
式（ＩＩ－ｂ）

［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、A_1、X_2、L_2、L_3、L_4、R_2、ＰＧおよびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させるステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。
【００８８】
本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）式（Ｊ）の化合物：
【００８９】
【化４１】



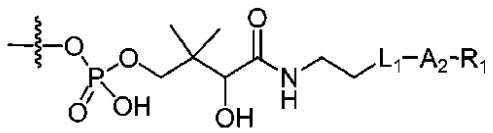
式（Ｊ）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｊ－ａ）の保護ホスホペンタチエニル基：
【００９０】
【化４２】



式（Ｊ－ａ）

［式中、R_1－ＰＧは、保護官能基R_1である］
をペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと、
（ｃ）保護ホスホペンタチエニル基を脱保護して、ペプチドタグに結合している式（Ｅ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基：
【００９１】
【化４３】



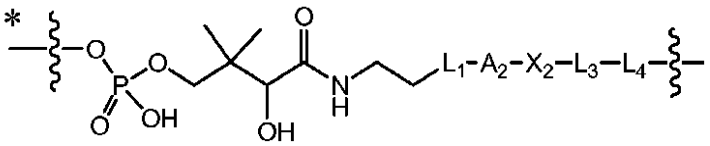
式（Ｅ－ａ）

［式中、R_1は官能基である］を得るステップと、
（ｄ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基R_1を式（ＩＩ－ｃ）の化合物
Ｘ－L_3－L_4－ＴＧ
式（ＩＩ－ｃ）

［式中、Ｘは、官能基Ｒ$_1$と反応する基であり、この際、
Ｘがチオールである場合、Ｒ$_1$は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または
Ｘがアジドである場合、Ｒ$_1$は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または
Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがアルキンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがアルケンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ$_1$は、ジアリールテトラジンであるか、または
Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ$_1$は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがケトンである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
ＸがＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールであるか、または
Ｘがマレイミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールである］
と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｄ）による構造を有するリンカー：

【００９２】

【化４４】



式（II－d）

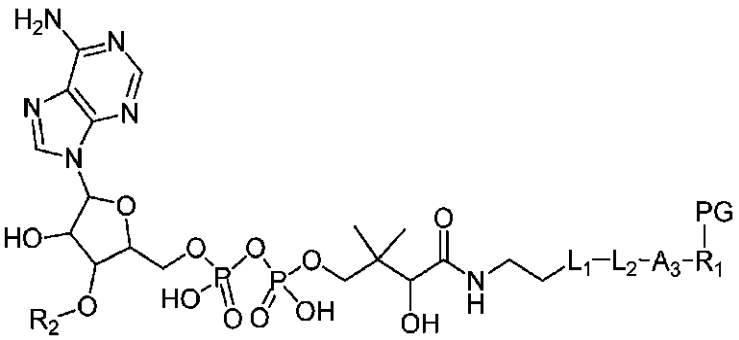
［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、Ｌ$_1$、Ａ$_2$、Ｘ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、Ｒ$_2$、ＰＧ、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させるステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【００９３】

本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）式（Ｋ）の化合物：

【００９４】

【化４５】

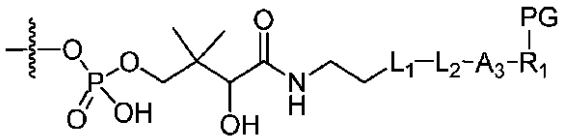


式（K）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｊ－ａ）の保護ホスホペンタチエニル基：

【００９５】

【化４６】



式（K－a）

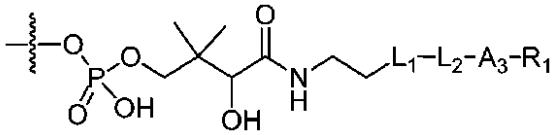
［式中、Ｒ１－ＰＧは、保護官能基Ｒ１である］

をペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと、

（ｃ）保護ホスホペンタチエニル基を脱保護して、ペプチドタグに結合している式（Ｆ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基：

【００９６】

【化４７】



式（F－a）

［式中、Ｒ１は官能基である］を得るステップと、

（ｄ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ１を式（ＩＩ－ｅ）の化合物

Ｘ－Ｌ４－ＴＧ

式（ＩＩ－ｅ）

［式中、Ｘは、官能基Ｒ１と反応する基であり、この際、

Ｘがチオールである場合、Ｒ１は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または

Ｘがアジドである場合、Ｒ１は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または

Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがアルキンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

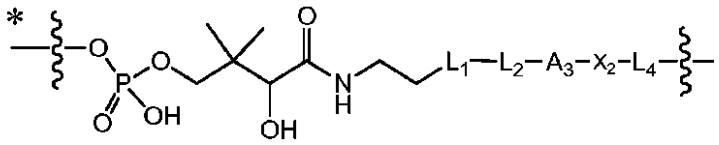
Ｘがアルケンである場合、Ｒ１はアジドであるか、または

Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ１は、ジアリールテトラジンであるか、または

Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ$_1$は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがケトンである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがｎｈ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールであるか、または
Ｘがマレイミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールである］
と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｆ）による構造を有するリンカー：

【００９７】

【化４８】



式(II－f)

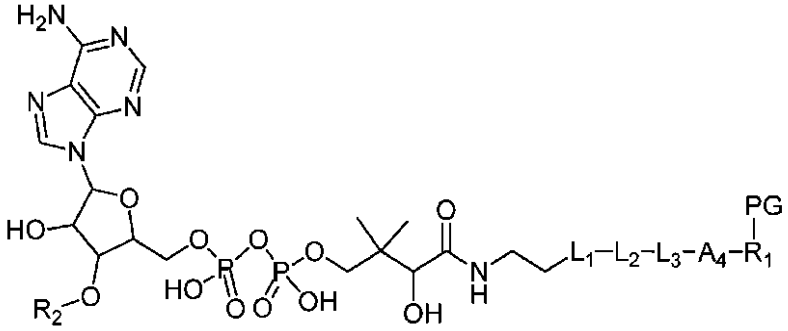
［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ａ$_3$、Ｘ$_2$、Ｌ$_4$、Ｒ$_2$、ＰＧ、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させるステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【００９８】

本明細書において提供する別の態様は、
（ａ）ペプチドタグを含み、そのペプチドタグが、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）式（Ｌ）の化合物：

【００９９】

【化４９】

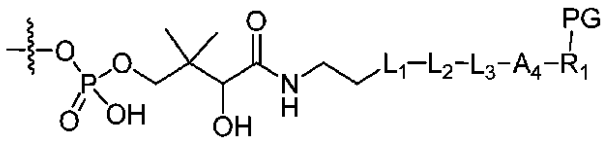


式(L)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｌ－ａ）の保護ホスホペンタチエニル基：

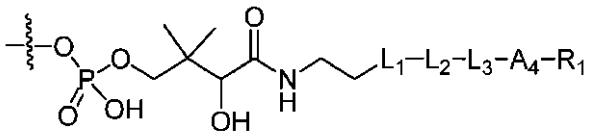
【０１００】

【化５０】



式（Ｌ－ａ）

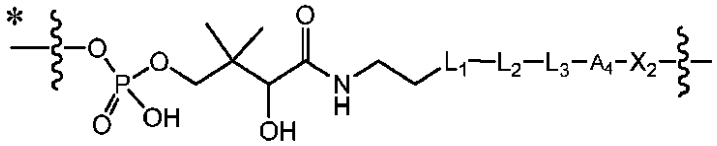
［式中、Ｒ$_1$－ＰＧは、保護官能基Ｒ$_1$である］
をペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を末端基（ＴＧ）で標識するステップと、
（ｃ）保護ホスホペンタチエニル基を脱保護して、ペプチドタグに結合している式（Ｇ－ａ）の活性化ホスホペンタチエニル基：
【０１０１】
【化５１】



式（Ｇ－ａ）

［式中、Ｒ$_1$は官能基である］を得るステップと、
（ｄ）活性化ホスホペンタチエニル基の官能基Ｒ$_1$を式（ＩＩ－ｇ）の化合物
Ｘ－ＴＧ
式（ＩＩ－ｇ）
［式中、Ｘは、官能基Ｒ$_1$と反応する基であり、この際、
Ｘがチオールである場合、Ｒ$_1$は、チオール、マレイミド、もしくはハロアセトアミドであるか、または
Ｘがアジドである場合、Ｒ$_1$は、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、もしくはオキサノボルナジエンであるか、または
Ｘがトリアリールホスフィンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがオキサノボルナジエンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがアルキンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがアルケンである場合、Ｒ$_1$はアジドであるか、または
Ｘがシクロオクテンである場合、Ｒ$_1$は、ジアリールテトラジンであるか、または
Ｘがジアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、シクロオクテンであるか、または
Ｘがモノアリールテトラジンである場合、Ｒ$_1$は、ノルボルネンであるか、または
Ｘがノルボルネンである場合、Ｒ$_1$は、モノアリールテトラジンであるか、または
Ｘがアルデヒドである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがケトンである場合、Ｒ$_1$は、ヒドロキシルアミンもしくはヒドラジンもしくはＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－であるか、または
Ｘがヒドロキシルアミンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがヒドラジンである場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
ＸがＮＨ$_2$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－である場合、Ｒ$_1$は、アルデヒドもしくはケトンであるか、または
Ｘがハロアセトアミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールであるか、または
Ｘがマレイミドである場合、Ｒ$_1$は、チオールである］
と反応させ、それによって、末端基を、式（ＩＩ－ｈ）による構造を有するリンカー：
【０１０２】

【化５２】



式（II－h）

［式中、＊は、ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合していることを示し、L_1、L_2、L_3、A_4、X_2、R_2、ＰＧ、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］によってペプチドタグに結合させるステップと
を含むプロセスによる免疫コンジュゲートの調製である。

【０１０３】

上記の調製方法のある特定の実施形態では、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－であり、

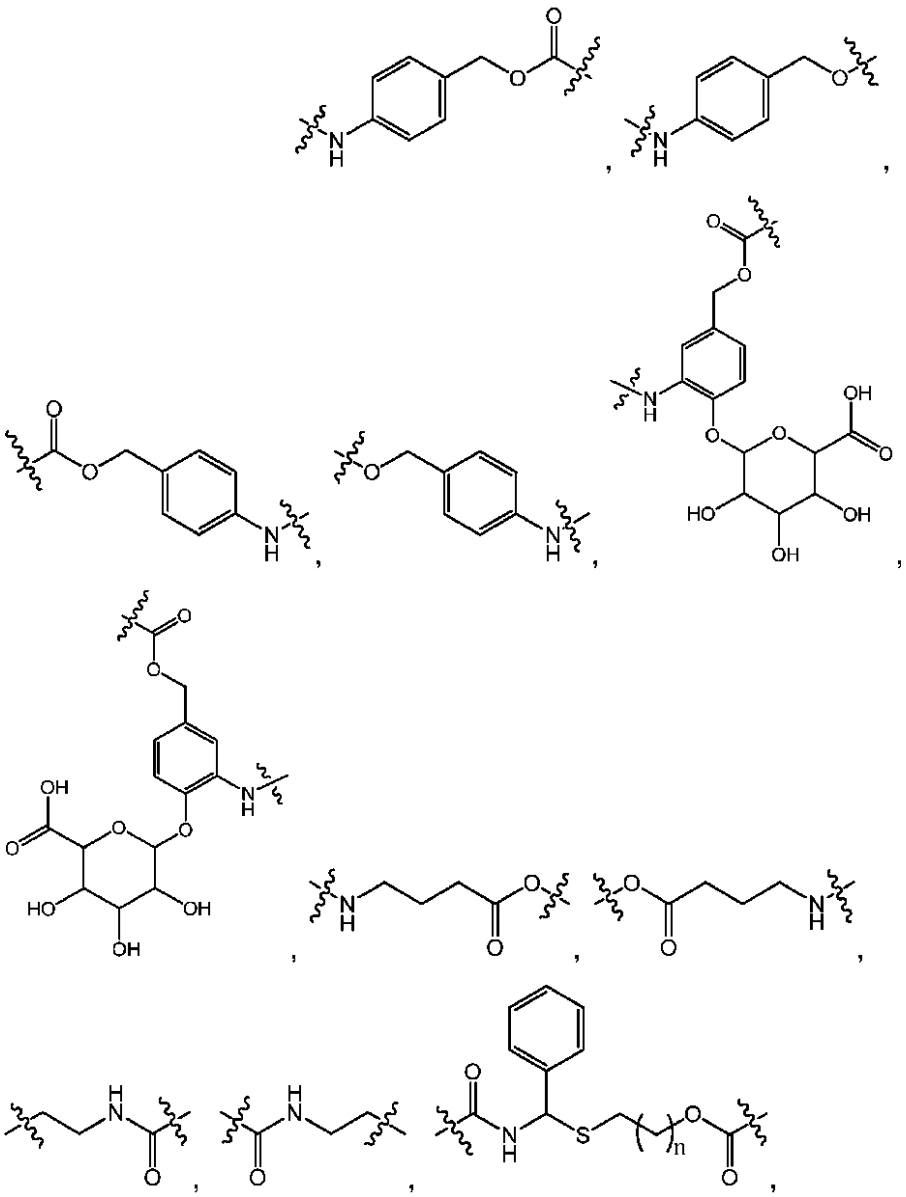
L_2は、結合、－A_2－、または－A_2X^2－であり、

L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、

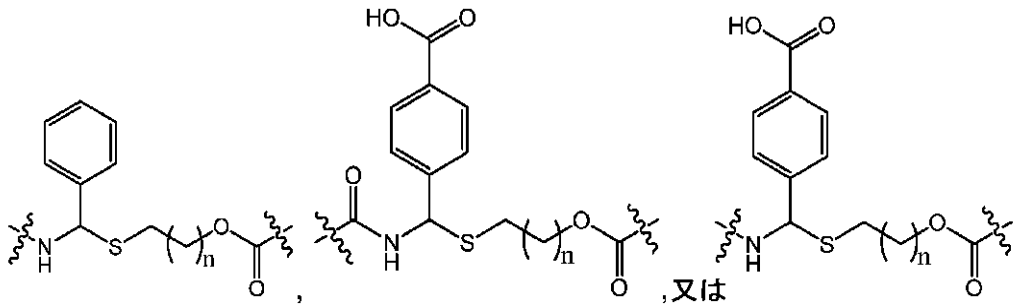
L_4は、結合、－A_4－、－A_4X^2－、

【０１０４】

【化５３－１】



【化５３－２】



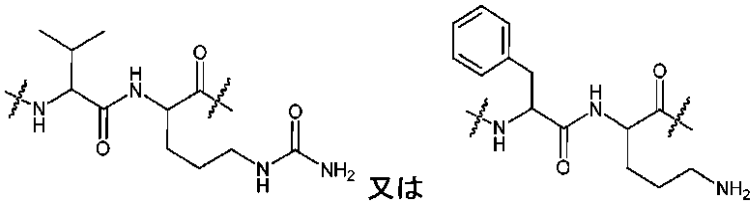
であり、

A_2は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NR^4－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4

$)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nS-$、$-(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_n-$、$-S(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH-$、$-(C(R^4)_2)_nNH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、

【０１０５】

【化５４】

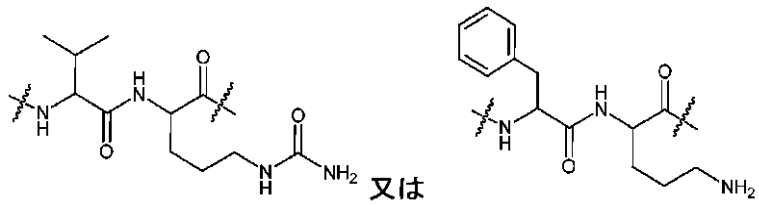


であり、

A_3は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nS-$、$-(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_n-$、$-S(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mC(=O)-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、

【０１０６】

【化５５】



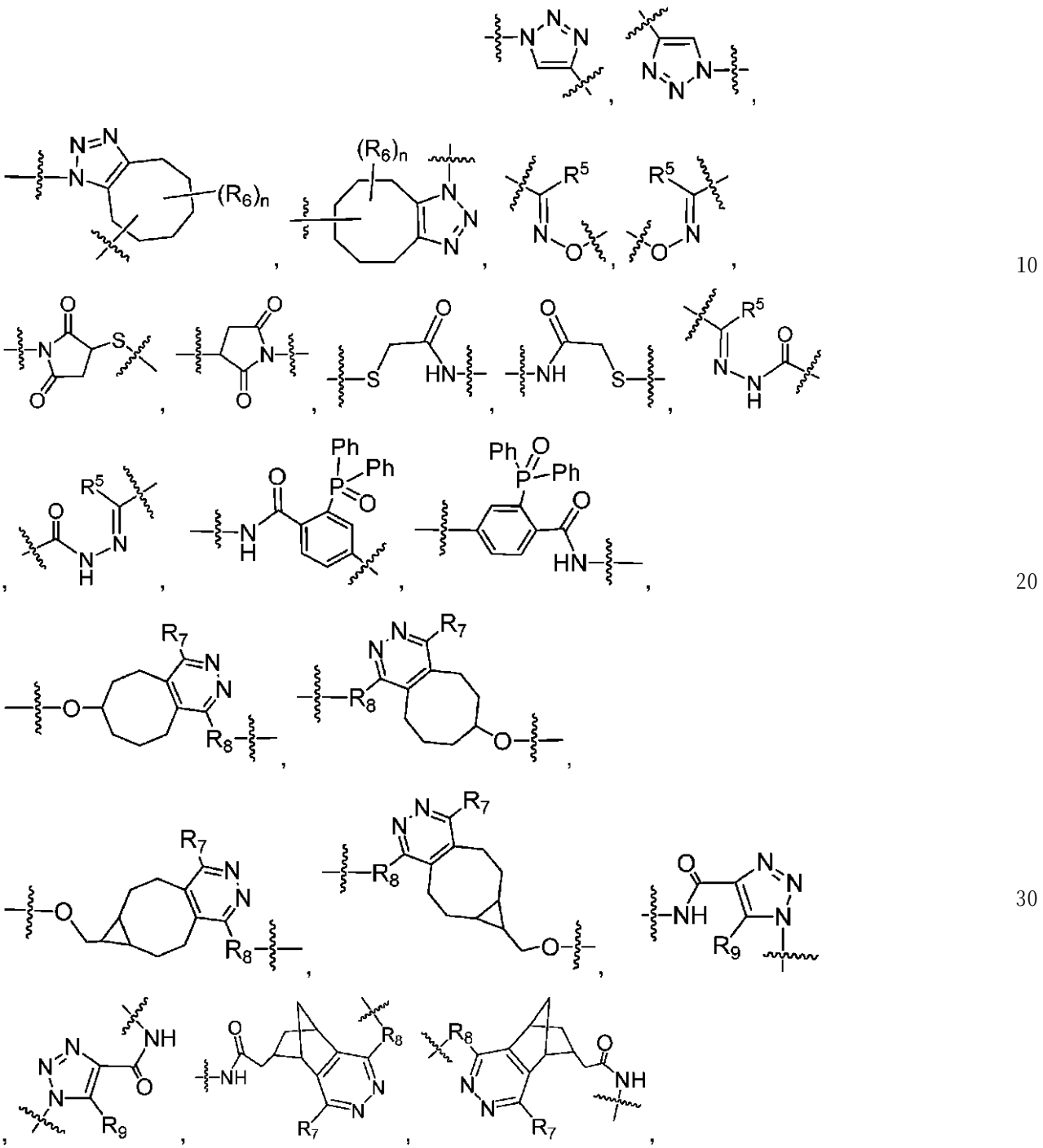
であり、

A_4は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^2は、独立に、結合、

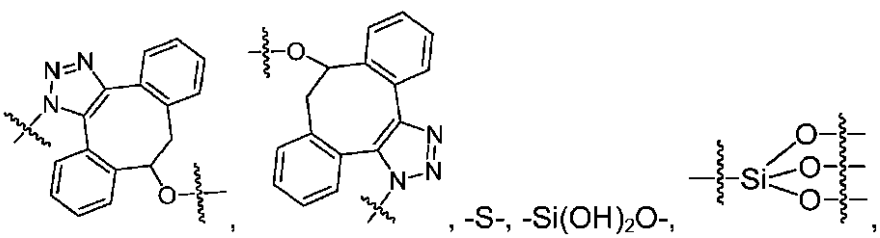
【０１０７】

【化５６】



【０１０８】

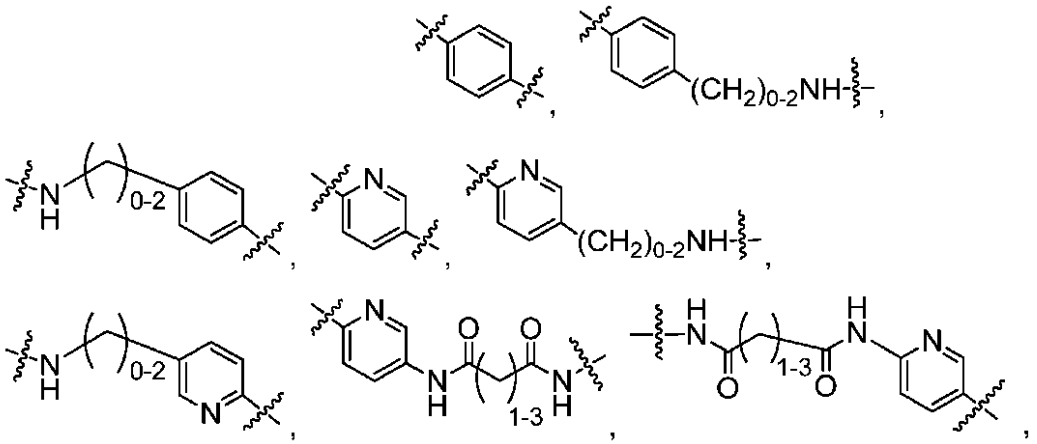
【化５７】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

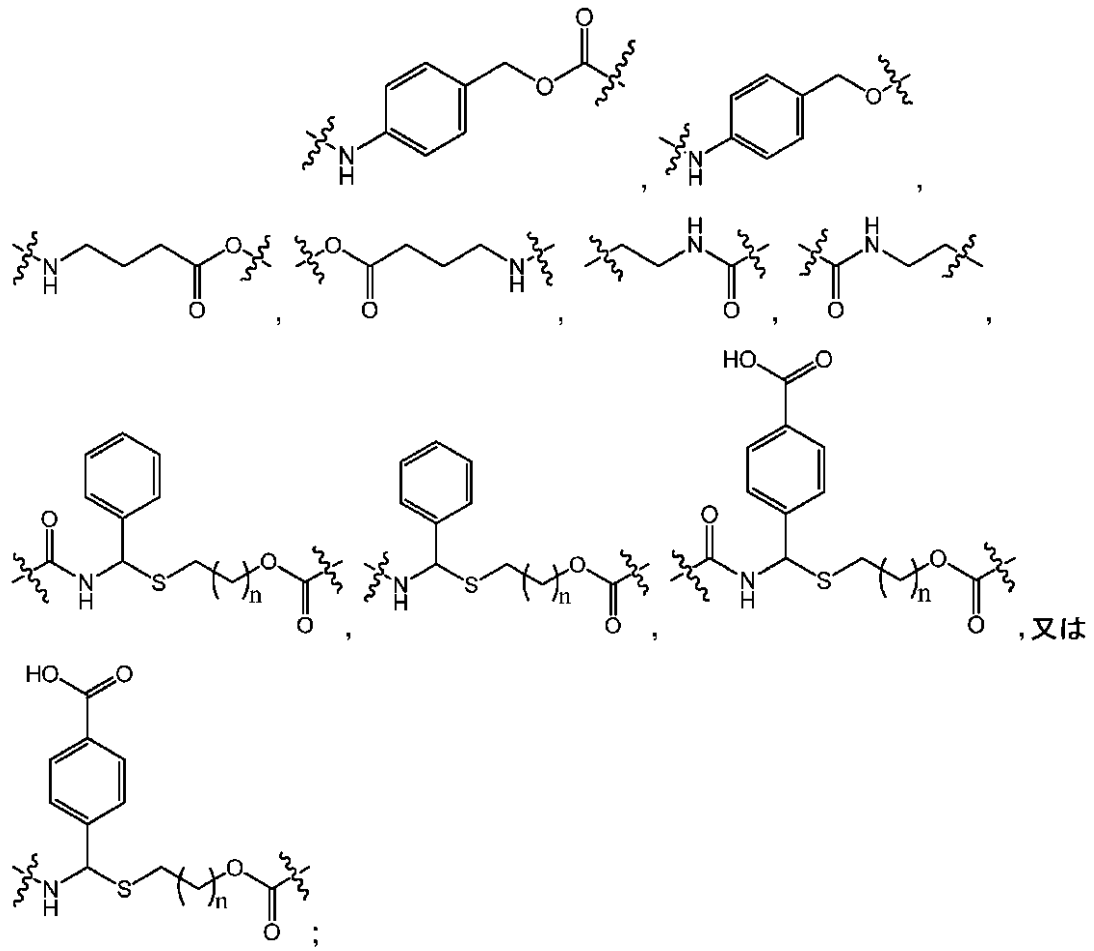
各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択

され、
各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニル、およびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、
【０１０９】
【化５８】



から選択され、
R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
ＴＧは、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、および多糖から選択される。
【０１１０】
上記の調製方法の他の実施形態では、
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－または－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－であり、
L_2は、結合、－A_2－、または－A_2X^2－であり、
L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、
L_4は、結合、－A_4－、－A_4X^2－、
【０１１１】

【化５９】



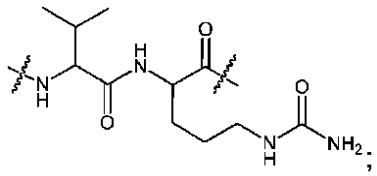
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－または－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－または

【０１１２】

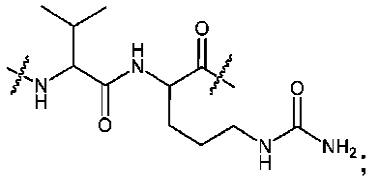
【化６０】



であり、

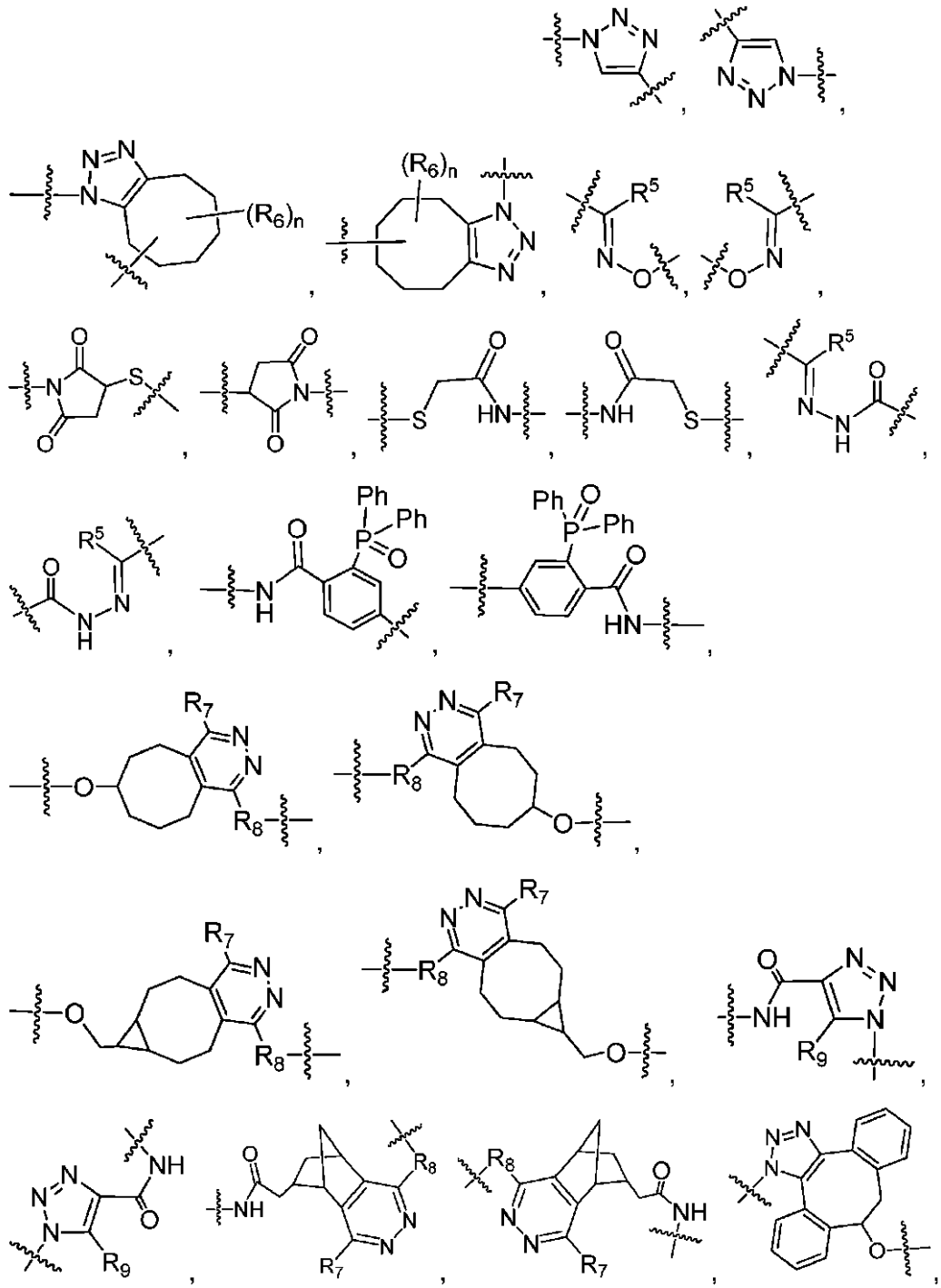
A_3は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－または

【０１１３】
【化６１】



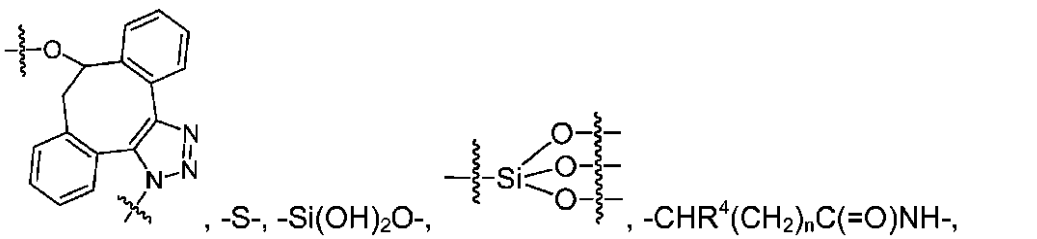
であり、
Ａ$_4$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－または－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、
各Ｘ^{2}は、独立に、結合、
【０１１４】

【化６２】



【０１１５】

【化６３】

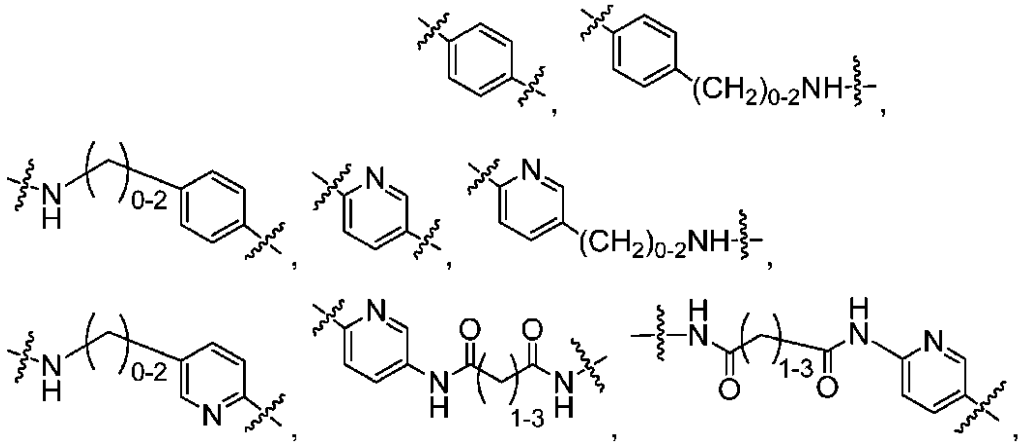


、-S-, -Si(OH)$_2$O-, 、-CHR^4(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,

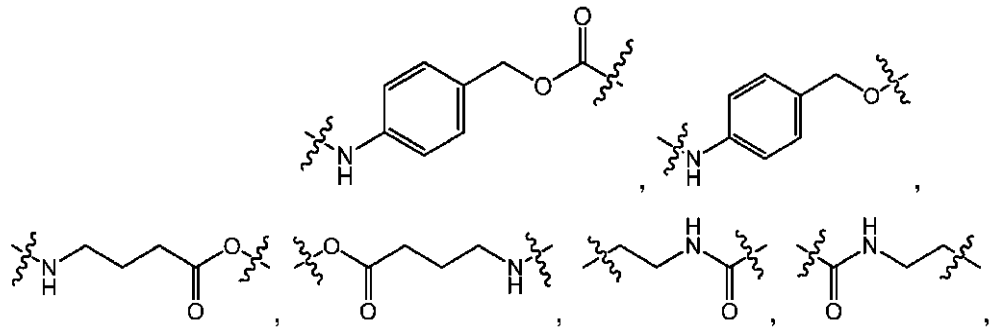
、－ＣＨＲ^4（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択

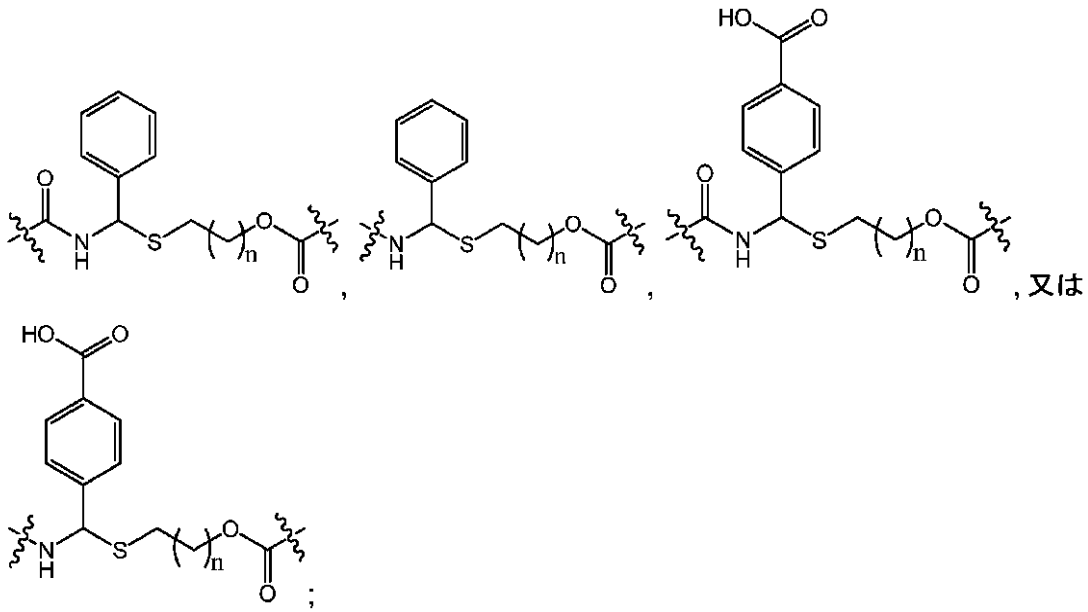
され、
各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニル、およびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、
【０１１６】
【化６４】



から選択され、
R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。
【０１１７】
上記の調製方法の他の実施形態では、
L_1は、結合、－A_1－、－A_1X^2－、または－X^2－であり、
L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、
L_4は、結合、－A_4－、－A_4X^2－、
【０１１８】
【化６５－１】



【化６５－２】



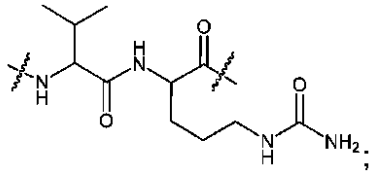
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－または－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－または

【０１１９】

【化６６】

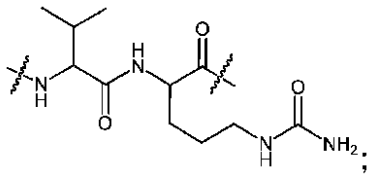


であり、

A_3は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－または

【０１２０】

【化６７】



であり、

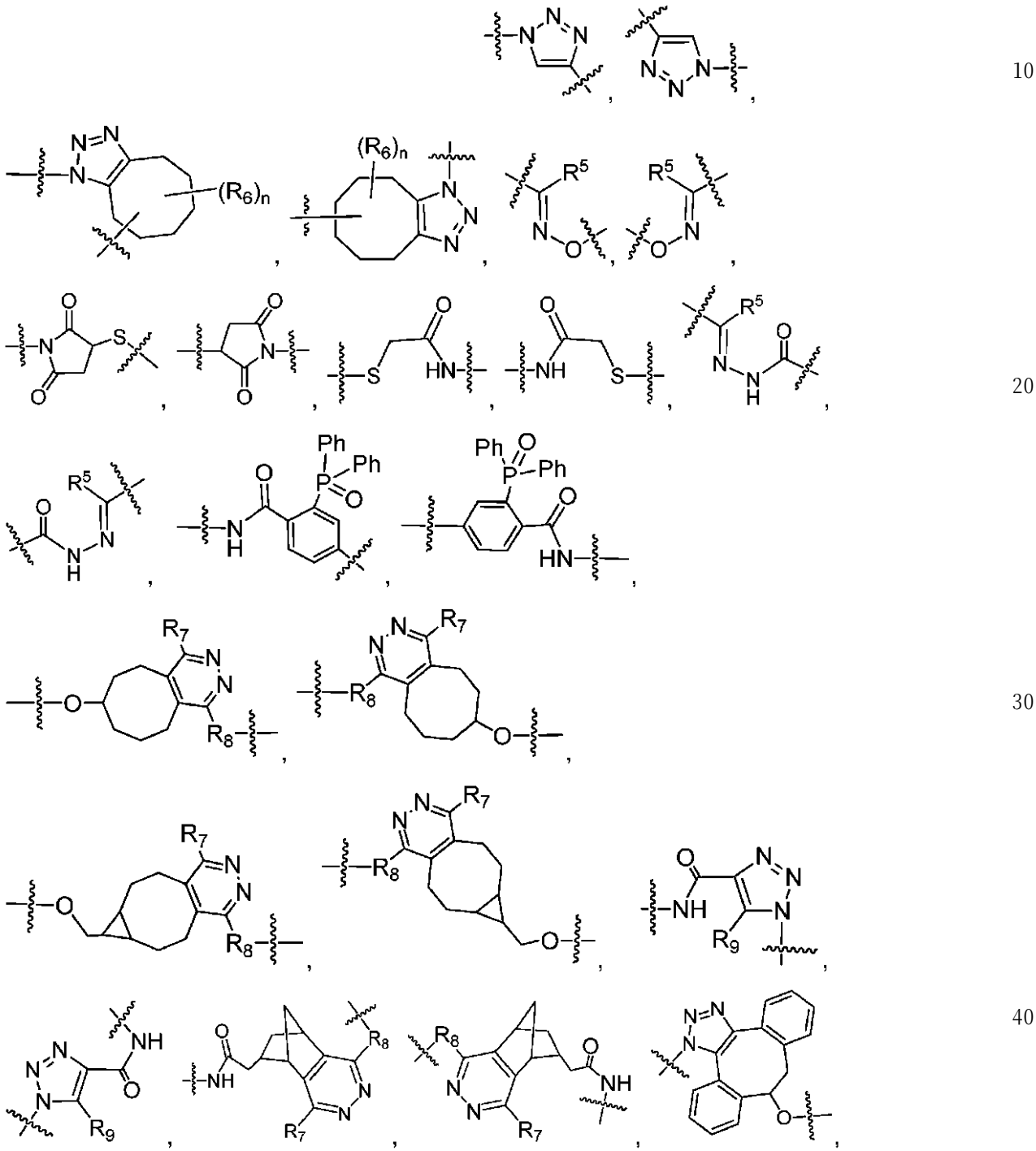
A_4は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（

$CH_2)_nS-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$または$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$であり、

各X^2は、独立に、結合、

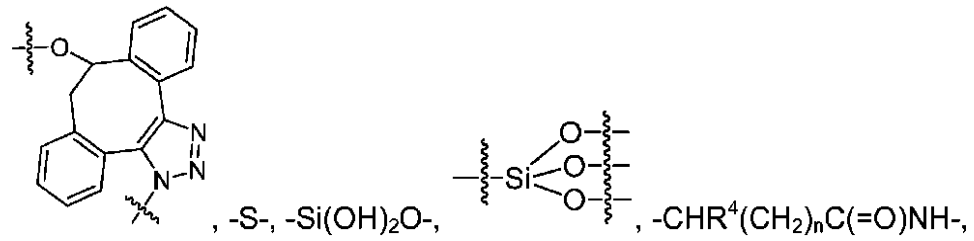
【０１２１】

【化６８】



【０１２２】

【化６９】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

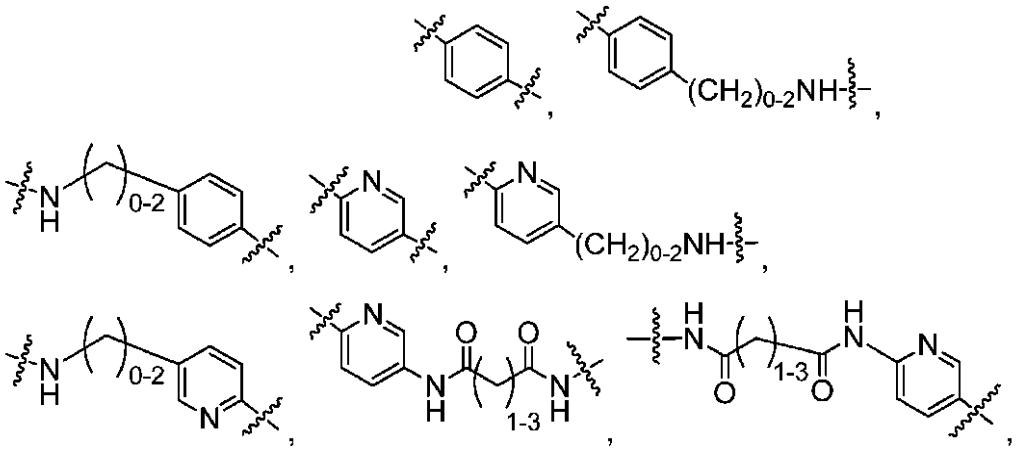
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【０１２３】

【化７０】



から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

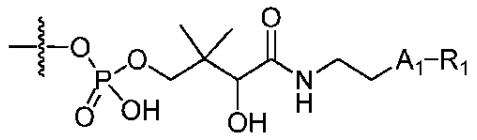
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。

【０１２４】

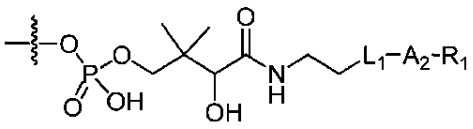
本明細書において提供する別の態様は、修飾抗体またはその抗体断片中のペプチドタグのセリン残基が、式（Ｄ－ａ）、式（Ｅ－ａ）、式（Ｆ－ａ）、または式（Ｇ－ａ）の構造を有する４’－ホスホパンテテイン基：

【０１２５】

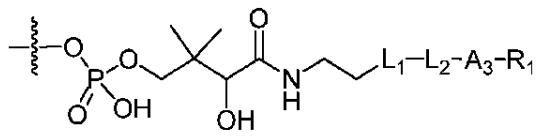
【化７１】



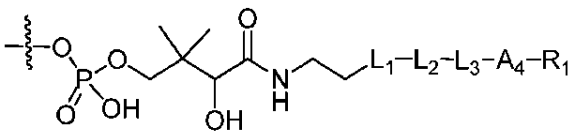
式（Ｄ－ａ）



式（Ｅ－ａ）



式（Ｆ－ａ）

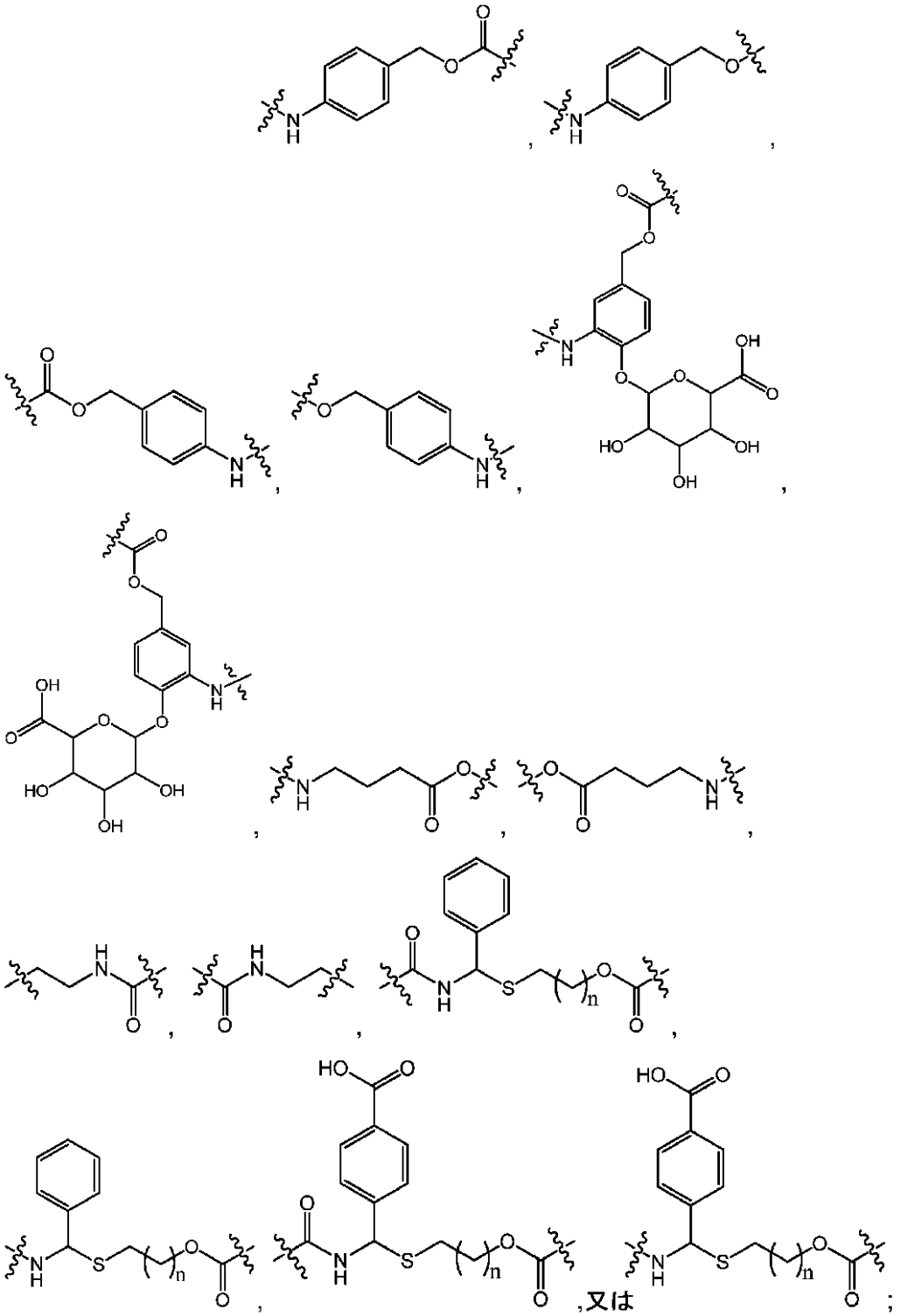


式（Ｇ－ａ）

［式中、
Ｌ$_{1}$は、－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－または－Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{2}$は、結合、－Ａ$_{2}$－、または－Ａ$_{2}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{3}$は、結合、－Ａ$_{3}$－、または－Ａ$_{3}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{4}$は、結合－Ａ$_{4}$－、－Ａ$_{4}$Ｘ^{2}－、

【０１２６】

【化７２】



であり、

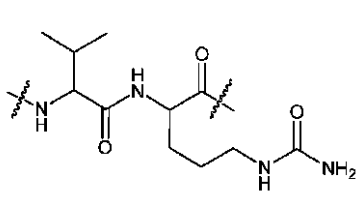
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（

＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－であり、

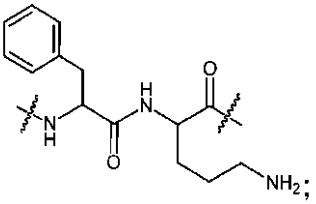
Ａ$_2$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^4－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、

【０１２７】

【化７３】



又は



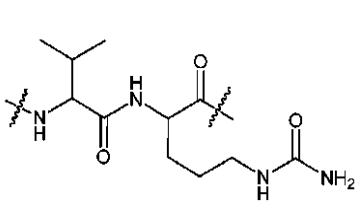
であり、

Ａ$_3$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（

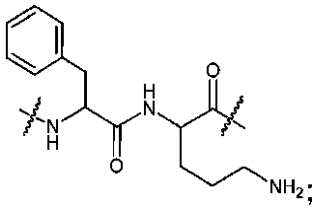
$CH_2)_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【０１２８】

【化７４】



又は



;

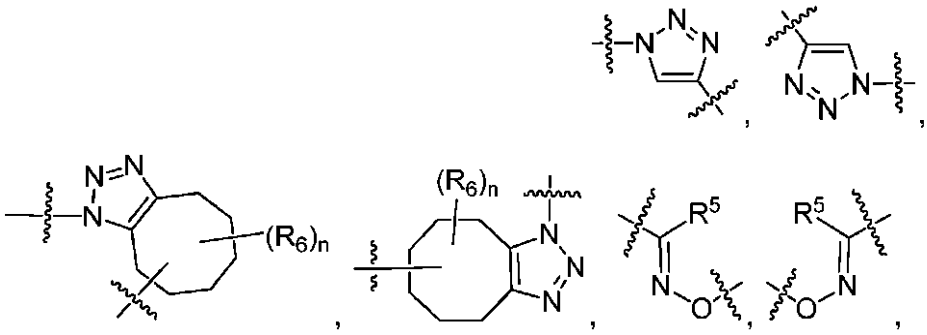
であり、

A_4は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^2は、独立に、結合、

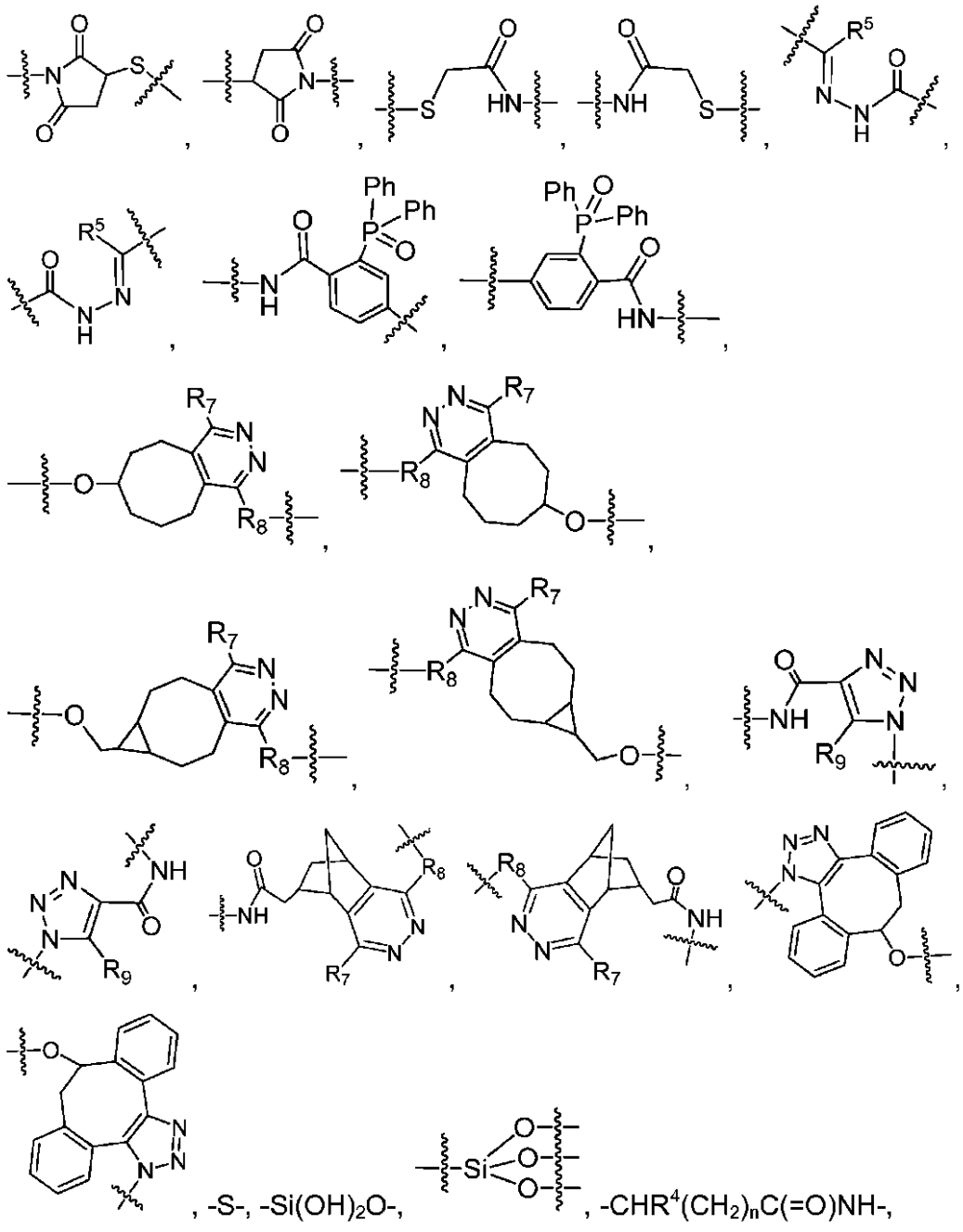
【０１２９】

【化７５】



【０１３０】

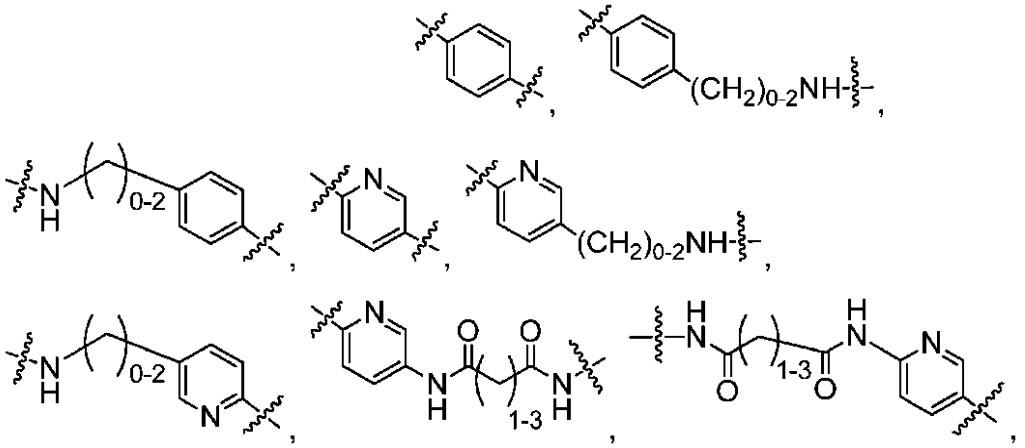
【化７６】



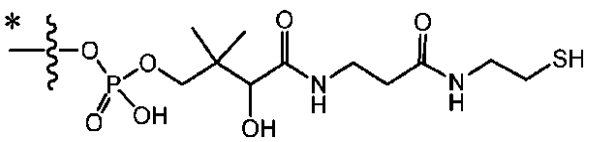
、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択

され、
各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニル、およびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、
【０１３１】
【化７７】

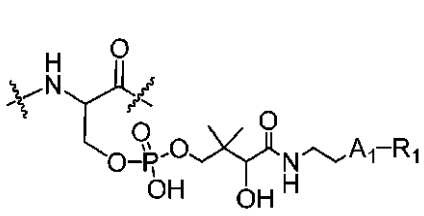
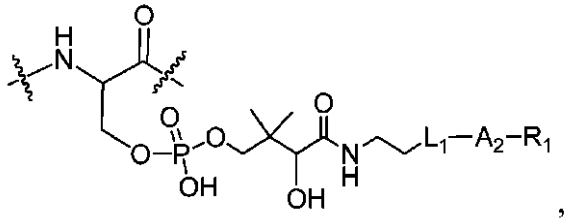
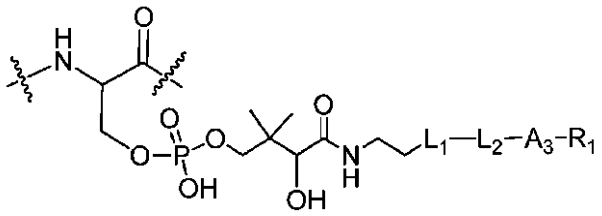
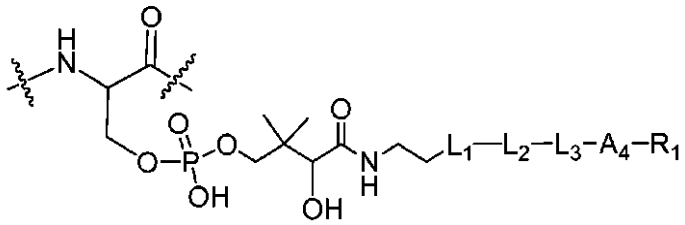


から選択され、
R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
R^1は、チオール、マレイミド、ハロアセトアミド、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、オキサノボルナジエン、アジド、ジアリールテトラジン、ノルボルネン、モノアリールテトラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、NH_2－NH－Ｃ（＝Ｏ）－、アルデヒド、またはケトンである］
とコンジュゲートしている本明細書において提供する修飾抗体または抗体断片を含むコンジュゲート抗体またはその抗体断片である。
【０１３２】
そのようなコンジュゲート抗体またはその抗体断片のある特定の実施形態では、４’－ホスホパンテテイン基は、
【０１３３】
【化７８】



である。
【０１３４】
そのようなコンジュゲート抗体またはその抗体断片のある特定の実施形態では、コンジュゲートセリンは、
【０１３５】

【化７９】


,

,

又は


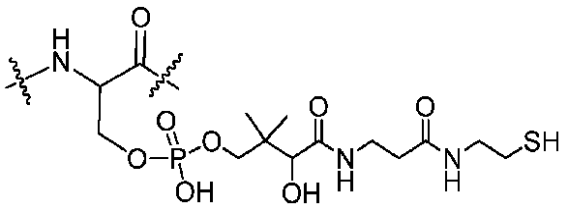
から選択される構造を有する。

【０１３６】

そのようなコンジュゲート抗体またはその抗体断片の他の実施形態では、コンジュゲートセリンは、

【０１３７】

【化８０】



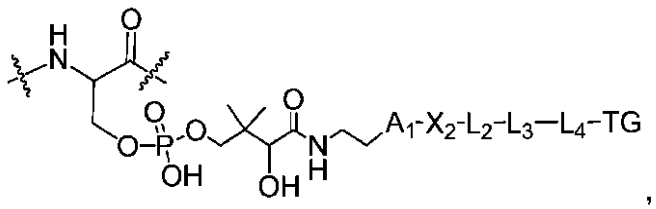
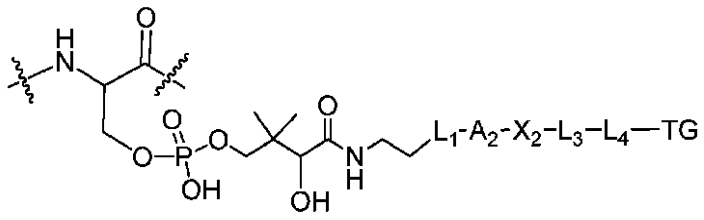
である。

【０１３８】

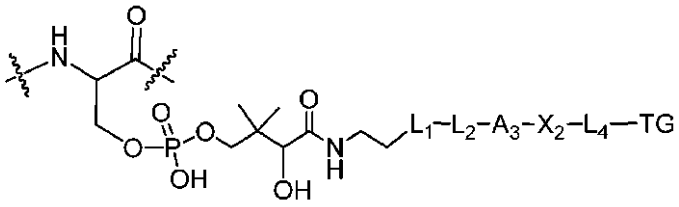
本明細書において提供する別の態様は、ペプチドタグのセリン残基が、修飾４’－ホスホパンテテイン基とコンジュゲートしており、そのコンジュゲートセリンが、

【０１３９】

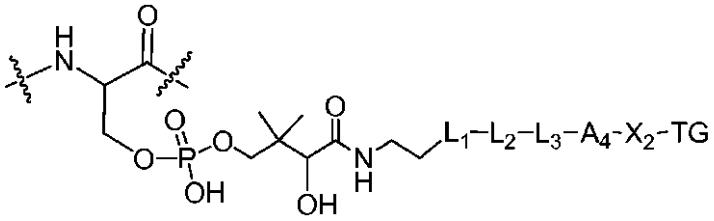
【化８１－１】


,

,

【化８１－２】



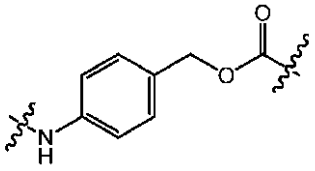
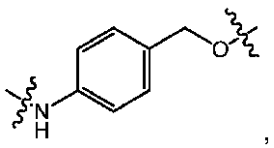
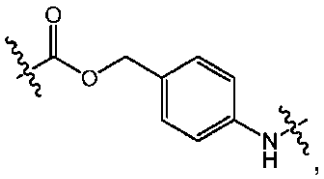
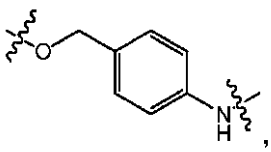
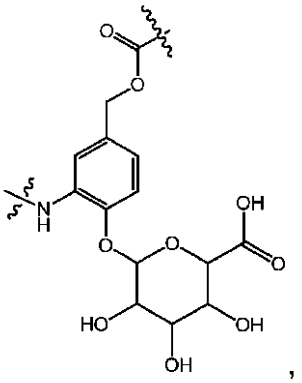
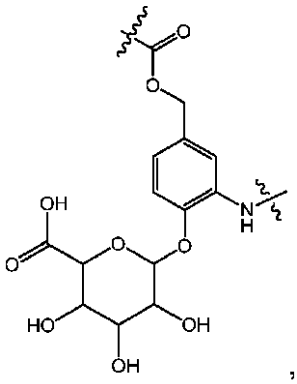
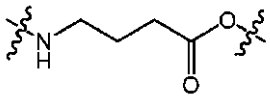
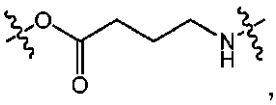
，及び



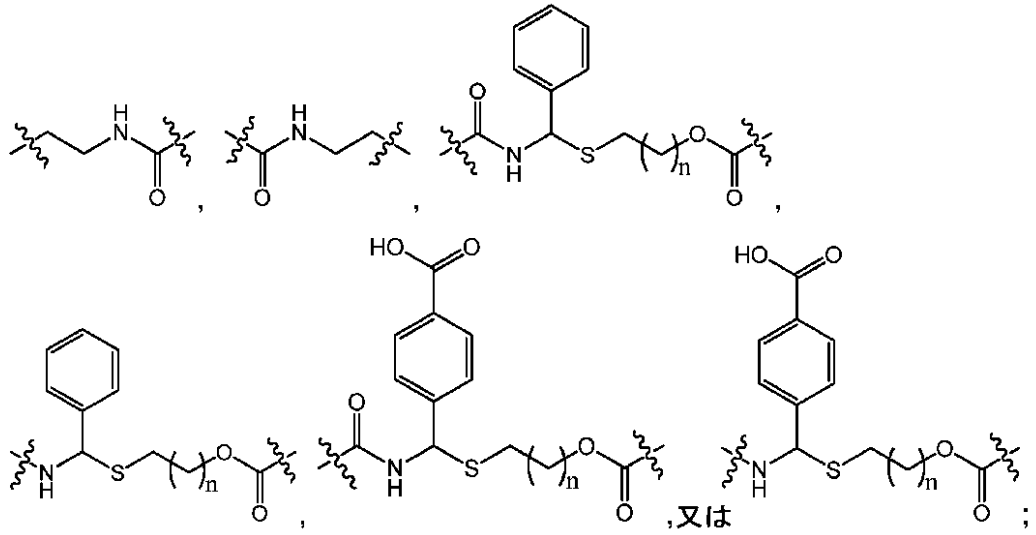
［式中、L_1は、$-A_1X^2-$または$-X^2-$であり、
L_2は、結合、$-A_2-$、または$-A_2X^2-$であり、
L_3は、結合、$-A_3-$、または$-A_3X^2-$であり、
L_4は、結合$-A_4-$、$-A_4X^2-$、

【０１４０】

【化８２－１】


，

，

，

，

，

，

，

，

【化８２－２】



であり、

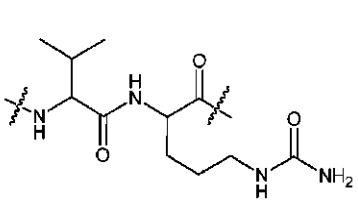
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－であり、

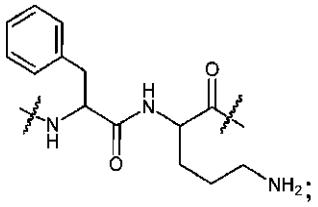
A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^4－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）

$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【０１４１】

【化８３】



又は


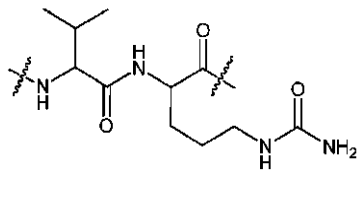
;

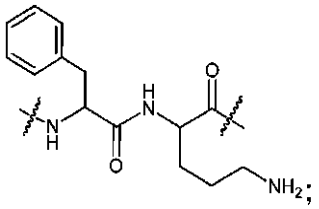
であり、

A_3は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$S－、－（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【０１４２】

【化８４】



又は


;

であり、

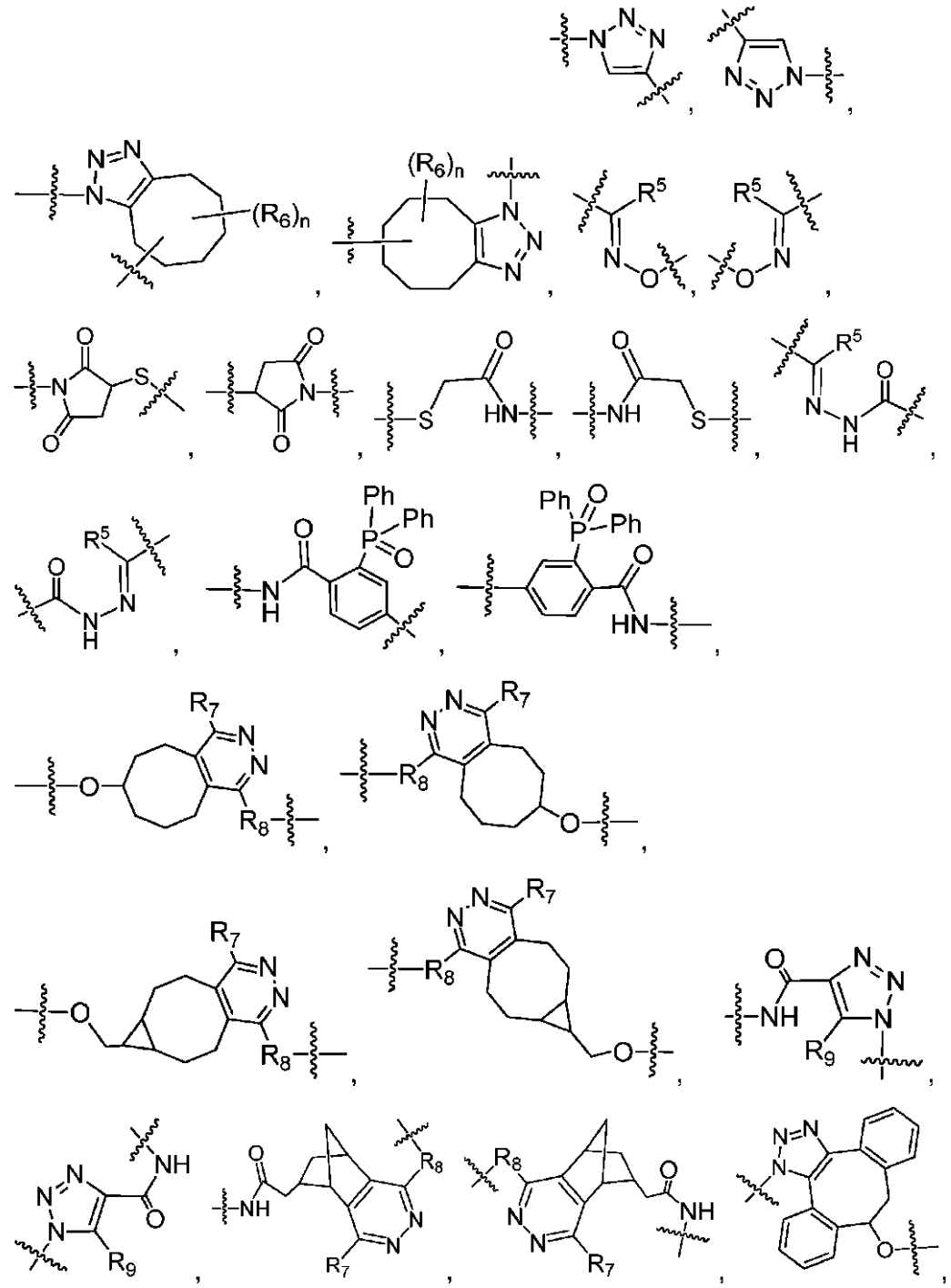
A_4は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$

$(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、または$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$であり、

各X^2は、独立に、結合、

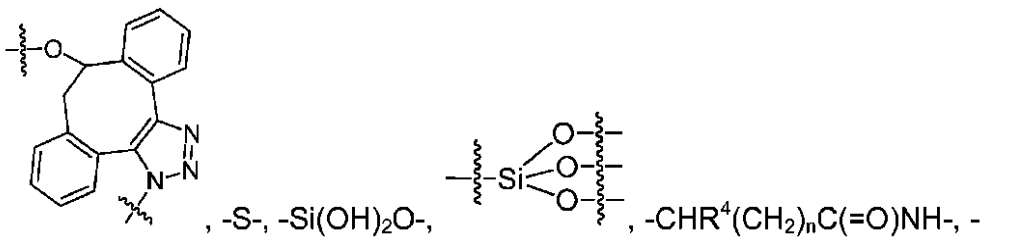
【０１４３】

【化８５】



【０１４４】

【化８６】

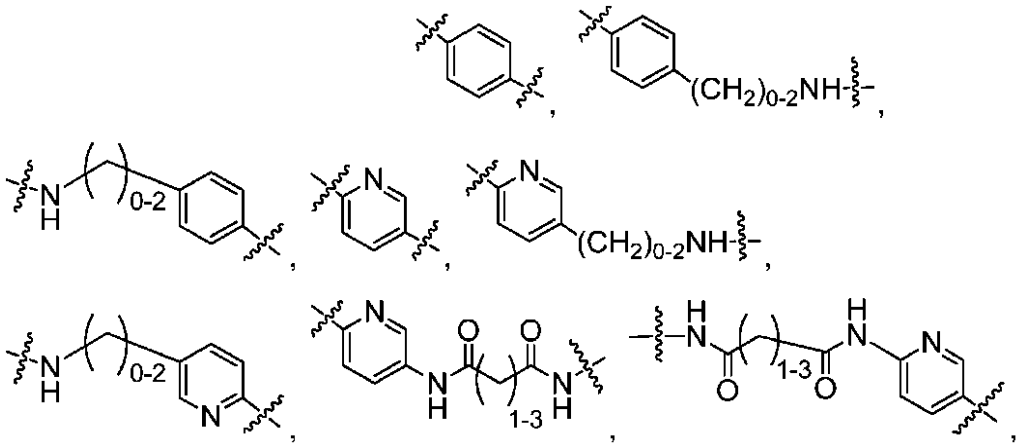


から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択

され、
各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニル、およびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、

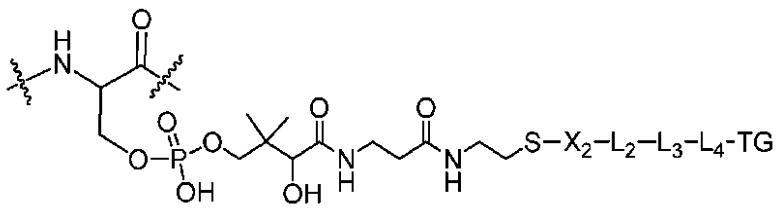
【０１４５】
【化８７】



から選択され、
R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
ＴＧは、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、アセチル基、または表面である］
から選択される構造を有する本明細書において提供する修飾抗体またはその抗体断片を含むコンジュゲート抗体またはその抗体断片である。

【０１４６】
そのようなコンジュゲート抗体またはその抗体断片のある特定の実施形態では、コンジュゲートセリンは、

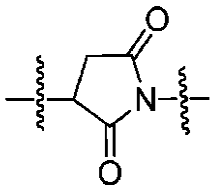
【０１４７】
【化８８】



である。そのようなコンジュゲート抗体またはその抗体断片では、X_2は、

【０１４８】

【化８９】



または－（ＣＨ$_2$）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－である。

【０１４９】

本発明はまた、有効量の本発明の免疫コンジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩と、薬学的に許容される賦形剤、担体、または添加剤とを含む医薬組成物を提供する。

【０１５０】

本発明は、癌などの疾患を治療する方法を提供し、この方法は、それを必要とする哺乳動物に、有効量の本発明の免疫コンジュゲートを投与することを含む。一部の実施形態では、本発明は、医薬として使用するための免疫コンジュゲートを提供する。一部の実施形態では、本発明は、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症（例えば、細菌、真菌、ウイルス）、遺伝的障害、心臓血管疾患、および／または代謝性疾患を治療するための医薬の製造における免疫コンジュゲートの使用を提供する。

【０１５１】

本発明は、本明細書に記載の免疫コンジュゲートを生成する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、４’－ホスホパンテテインによって一緒に連結している抗体または抗体断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートの形成を促進する適切な条件下で、本発明の修飾抗体または抗体断片、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、およびＣｏＡに連結した末端基をインキュベートすることを含む。具体的な実施形態では、適切な条件は、４℃～３７℃の温度およびｐＨ６．５～ｐＨ９．０を含む。

【０１５２】

本明細書に記載の免疫コンジュゲートを生成するそのような方法の別の実施形態では、この方法は、適切な条件下で、本発明の修飾抗体または抗体断片、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、およびＣｏＡに連結している末端基またはＣｏＡ類似体に連結している末端基をインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートの形成を促進することを含む。具体的な実施形態では、適切な条件は、４℃～３７℃の温度およびｐＨ６．５～ｐＨ９．０を含む。

【０１５３】

本明細書に記載の免疫コンジュゲートを生成するそのような方法の別の実施形態では、この方法は、

ｉ）適切な条件下で、本発明の修飾抗体または抗体断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたはＣｏＡ類似体と共にインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を抗体または抗体断片に結合させるステップであって、４’－ホスホパンテテインおよび４’－ホスホパンテテイン類似体は官能基を含むステップと、

ｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を、末端基に連結していてもよい反応性基と反応させ、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを形成するステップと

を含む。

【０１５４】

具体的な実施形態では、適切な条件は、４℃～３７℃の温度およびｐＨ６．５～ｐＨ９．０を含む。

【０１５５】

本明細書に記載の免疫コンジュゲートを生成するそのような方法の別の実施形態では、

この方法は、
ｉ）適切な条件下で、本発明の修飾抗体または抗体断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたはＣｏＡ類似体と共にインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を抗体または抗体断片に結合させるステップであって、４’－ホスホパンテテインおよび４’－ホスホパンテテイン類似体は保護官能基を含むステップと、
ｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体の保護官能基を脱保護するステップと、
ｉｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体の脱保護官能基を、末端基に連結していてもよい反応性基と反応させ、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを形成するステップとを含む。

【０１５６】
具体的な実施形態では、適切な条件は、４℃～３７℃の温度およびｐＨ６．５～ｐＨ９．０を含む。

【０１５７】
定義
用語「アルケニル」または「アルケン」は、本明細書で使用する場合、少なくとも１個の炭素－炭素二重結合を有する分枝または直鎖炭化水素を指す。二重結合のまわりに配置されている原子は、シス（Ｚ）またはトランス（Ｅ）配置である。本明細書で使用する場合、用語「C_2～C_4アルケニル」、「C_2～C_5アルケニル」、「C_2～C_6アルケニル」、「C_2～C_7アルケニル」、「C_2～C_8アルケニル」、「C_2～C_4アルケン」、「C_2～C_5アルケン」、「C_2～C_6アルケン」、「C_2～C_7アルケン」、および「C_2～C_8アルケン」は、少なくとも１個の炭素－炭素二重結合を有し、少なくとも２個、多くて４、５、６、７、または８個の炭素原子をそれぞれ含有する分枝または直鎖炭化水素を指す。アルケニル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、エテニル、エタン、プロペニル、プロペン、アリル（２－プロペニル）、２－プロペン、ブテニル、ペンテニル、ペンテン、ヘキセニル、ヘプテニル、ヘプテン、オクテニル、ノネニル、ノネン、デセニル、デセンなどが含まれる。別段に指定していなければ、アルケニル基は一般に、C_2～C_6アルケニルである。

【０１５８】
用語「アルキニル」または「アルキン」は、本明細書で使用する場合、少なくとも１個の炭素－炭素三重結合を有する分枝または直鎖炭化水素ラジカルを指す。本明細書で使用する場合、用語「C_2～C_4アルキニル」、「C_2～C_5アルキニル」、「C_2～C_6アルキニル」、「C_2～C_7アルキニル」、および「C_2～C_8アルキニル」は、少なくとも１個の炭素－炭素三重結合を有し、少なくとも２個、多くて４、５、６、７、または８個の炭素原子をそれぞれ含有する分枝または直鎖炭化水素ラジカルを指す。アルキニル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニルなどが含まれる。別段に指定していなければ、アルキニル基は一般に、C_2～C_6アルキニルである。

【０１５９】
用語「アルキル」は、本明細書で使用する場合、飽和の分枝または直鎖炭化水素を指す。本明細書で使用する場合、用語「C_1～C_3アルキル」、「C_1～C_4アルキル」、「C_1～C_5アルキル」、「C_1～C_6アルキル」、「C_1～C_7アルキル」、または「C_1～C_8アルキル」は、少なくとも１個、多くて３、４、５、６、７、または８個の炭素原子をそれぞれ含有する飽和の分枝または直鎖炭化水素を指す。アルキル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなどが含まれる。別段に指定していなければ

、アルキル基は一般に、C_1～C_6アルキルである。

【０１６０】

用語「アルコキシ」は、本明細書で使用する場合、基－OR_aを指し、この際、R_aは、本明細書において定義するとおりのアルキル基である。本明細書で使用する場合、用語「C_1～C_3アルコキシ」、「C_1～C_4アルコキシ」、「C_1～C_5アルコキシ」、「C_1～C_6アルコキシ」、「C_1～C_7アルコキシ」、および「C_1～C_8アルコキシ」は、アルキル部分が少なくとも１個、多くて３、４、５、６、７、または８個の炭素原子を含有するアルコキシ基を指す。アルコキシ基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、イソプロポキシ、ｎ－ブチルオキシ、ｔ－ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ、ノニルオキシ、デシルオキシなどが含まれる。

【０１６１】

用語「アリール」は、本明細書で使用する場合、合計６～１４環員を有し、系中の少なくとも１個の環が芳香族である単環式、二環式、および三環式環系を指す。アリール基にはまたは、１個または複数の非芳香族炭化水素環に縮合した１個または複数の芳香環が含まれる。アリール基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、フェニル（Ｐｈ）、ナフチル、フルオレニル、インデニル、アズレニル、アントラセニルなどが含まれる。アリール基は、１個または複数の置換基を含有してよく、したがって、「置換されていてもよい」。別段の指定がない限り、アリール基は、４個までの置換基を有し得る。

【０１６２】

用語「シクロアルキル」は、本明細書で使用する場合、飽和単環式、融合二環式、融合三環式、または架橋多環式環アセンブリを指す。本明細書で使用する場合、用語「C_3～C_5シクロアルキル」、「C_3～C_6シクロアルキル」、「C_3～C_7シクロアルキル」、「C_3～C_8シクロアルキル」、「C_3～C_9シクロアルキル」、および「C_3～C_{10}シクロアルキル」は、少なくとも３個、多くて５、６、７、８、９、または１０個の炭素原子を含有する飽和単環式、縮合二環式、縮合三環式、または架橋多環式環アセンブリを指す。シクロアルキル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、デカヒドロナフタレニルなどが含まれる。別段に指定していなければ、シクロアルキル基は一般に、C_3～C_8シクロアルキルである。

【０１６３】

用語「シクロアルケニル」または「シクロアルケン」は、本明細書で使用する場合、少なくとも１個の炭素－炭素二重結合を有する単環式、縮合二環式、縮合三環式、または架橋多環式環アセンブリを指す。二重結合のまわりに配置された原子は、シス（Ｚ）またはトランス（Ｅ）配置のいずれかである。単環式シクロアルケンは、１個または２個のアリール環に縮合していてよい。シクロアルケニル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル、シクロノネニル、シクロデセニルなどが含まれる。別段に指定していなければ、シクロアルケニル基は一般に、C_5～C_8シクロアルケニルである。

【０１６４】

用語「シクロアルキニル」または「シクロアルキン」は、本明細書で使用する場合、少なくとも１個の炭素－炭素三重結合を有する単環式、縮合二環式、縮合三環式、または架橋多環式環アセンブリを指す。単環式シクロアルキンは、１個または２個のアリール環に縮合していてよい。シクロアルキニル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、シクロプロピニル、シクロブチニル、シクロペンチニル、シクロヘキシニル、シクロヘプチニル、シクロオクチニル、シクロノニニル、シクロデシニルなどが含まれる。別段に指定していなければ、シクロアルキニル基は一般に、C_6～C_8シクロアルキニルである。

【０１６５】

用語「ヘテロアリール」は、本明細書で使用する場合、窒素、酸素、および硫黄から独

立に選択される１～４個のヘテロ原子を有する５～６員ヘテロ芳香族単環式環、窒素、酸素、および硫黄から独立に選択される１～４個のヘテロ原子を環員として有し、環のうちの少なくとも１個が芳香族である８～１０員縮合二環式環、または窒素、酸素、および硫黄から独立に選択される１～４個のヘテロ原子を有し、環のうちの少なくとも１個が芳香族である１２～１４員縮合三環式環を指す。そのような縮合二環式および三環式環系は、１個または複数のアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクロアルキル環に縮合していてよい。ヘテロアリール基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、２－または３－フリル；１－、２－、４－、または５－イミダゾリル；３－、４－、または５－イソチアゾリル；３－、４－、または５－イソオキサゾリル；２－、４－、または５－オキサゾリル；４－または５－１，２，３－オキサジアゾリル；２－または３－ピラジニル；１－、３－、４－、または５－ピラゾリル；３－、４－、５－または６－ピリダジニル；２－、３－、または４－ピリジル；２－、４－、５－または６－ピリミジニル；１－、２－または３－ピロリル；１－または５－テトラゾリル；２－または５－１，３，４－チアジアゾリル；２－、４－、または５－チアゾリル；２－または３－チエニル；２－、４－または６－１，３，５－トリアジニル；１－、３－または５－１，２，４－トリアゾリル；１－、４－または５－１，２，３－トリアゾリル；１－、２－、３－、４－、５－、６－、７－、８－、または９－アクリジニル；１－、３－、４－、５－、６－、７－、８－、９－、または１０－ベンゾ［ｇ］イソキノリン；２－、４－、５－、６－、または７－ベンゾオキサゾリル；１－、２－、４－、５－、６－、または７－ベンゾイミダゾリル；２－、４－、５－、６－、または７－ベンゾチアゾリル；２－、３－、４－、５－、６－、７－ベンゾ［ｂ］チエニル；２－、３－、４－、５－、６－、７－、８－、９－ベンゾ［ｂ］オキセピン；２－、４－、５－、６－、７－、または８－ベンゾオキサジニル；１－、２－、３－、４－、５－、６－、７－、８、または９－カルバゾリル；３－、４－、５－、６－、７－、または８－シンノリニル；２－、４－、または５－４Ｈ－イミダゾ［４，５－ｄ］チアゾリル；２－、３－、５－、または６－イミダゾ［２，１－ｂ］チアゾリル；２－、３－、６－、または７－イミダゾ［１，２－ｂ］［１，２，４］トリアジニル；１－、３－、４－、５－、６－、または７－インダゾリル；１－、２－、３－、５－、６－、７－、または８－インドリジニル；１－、２－、３－、４－、５－、６－、または７－インドリル；１－、２－、３－、４－、５－、６－、または７－イソインドリル；１－、３－、４－、５－、６－、７－、または８－イソキノリイル；２－、３－、４－、５－、６－、または７－ナフチリジニル；１－、２－、４－、５－、６－、７－、８－、または９－ペリミジニル；１－、２－、３－、４－、６－、７－、８－、９－、または１０－フェナントリジニル；１－、２－、３－、４－、５－、６－、７－、８－、９－、または１０－フェナトロリニル；１－、２－、３－、４－、６－、７－、８－、または９－フェナジニル；１－、２－、３－、４－、６－、７－、８－、９－、または１０－フェノチアジニル；１－、２－、３－、４－、６－、７－、８－、９－、または１０－フェノキサジニル；１－、４－、５－、６－、７－、または８－フタラジニル；２－、４－、６－、または７－プテリジニル；２－、６－、７－、または８－プリニル；２－、３－、５－、６－、７－、８－、９－、１０－、または１１－７Ｈ－ピラジノ［２，３－ｃ］カルバゾリル；２－、３－、５－、６－、または７－フロ［３，２－ｂ］－ピラニル；１－、３－、または５－１Ｈ－ピラゾロ［４，３－ｄ］－オキサゾリル；２－、３－、５－、または８－ピラジノ［２，３－ｄ］ピリダジニル；１－、２－、３－、４－、５－、または８－５Ｈ－ピリド［２，３－ｄ］－ｏ－オキサジニル；１－、２－、３－、４－、６－、７－、８－、または９－キノリジニル；２－、３－、４－、５－、６－、７－、または８－キノリニル；２－、３－、４－、５－、６－、７－、または８－キナゾリニル；２－、３－、４－、または５－チエノ［２，３－ｂ］フラニル、および１－、３－、６－、７－、８－、または９－フロ［３，４－ｃ］シンノリニルが含まれる。

【０１６６】

用語「ヘテロ原子」は、本明細書で使用する場合、窒素（Ｎ）、酸素（Ｏ）、または硫黄（Ｓ）原子を指す。

【０１６７】
用語「ヘテロシクロアルキル」は、本明細書で使用する場合、炭化水素環構造の環炭素のうちの１～４個が－Ｏ－、－ＮＲ－、および－Ｓ－から独立に選択される１～４個の基によって置き換えられていて、この際、Ｒが水素、$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキル、またはアミノ保護基である飽和３～８員単環式炭化水素環構造、飽和６～９員縮合二環式炭化水素環構造、または飽和１０～１４員縮合三環式炭化水素環構造を指す。ヘテロシクロアルキル基の非限定的な例には、本明細書で使用する場合、アジリジニル、アジリジン－１－イル、アジリジン－２－イル、アジリジン－３－イル、オキシラニル、オキシラン－２－イル、オキシラン－３－イル、チイラニル、チイラン－２－イル、チイラン－３－イル、アゼタジニル、アゼタジン－１－イル、アゼタジン－２－イル、アゼタジン－３－イル、オキセタニル、オキセタン－２－イル、オキセタン－３－イル、オキセタン－４－イル、チエタニル、チエタン－２－イル、チエタン－３－イル、チエタン－４－イル、ピロリジニル、ピロリジン－１－イル、ピロリジン－２－イル、ピロリジン－３－イル、ピロリジン－４－イル、ピロリジン－５－イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロフラン－２－イル、テトラヒドロフラン－３－イル、テトラヒドロフラン－４－イル、テトラヒドロフラン－５－イル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロチエン－２－イル、テトラヒドロチエン－３－イル、テトラヒドロチエン－４－イル、テトラヒドロチエン－５－イル、ピペリジニル、ピペリジン－１－イル、ピペリジン－２－イル、ピペリジン－３－イル、ピペリジン－４－イル、ピペリジン－５－イル、ピペリジン－６－イル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピラン－２－イル、テトラヒドロピラン－３－イル、テトラヒドロピラン－４－イル、テトラヒドロピラン－５－イル、テトラヒドロピラン－６－イル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチオピラン－２－イル、テトラヒドロチオピラン－３－イル、テトラヒドロチオピラン－４－イル、テトラヒドロチオピラン－５－イル、テトラヒドロチオピラン－６－イル、ピペラジニル、ピペラジン－１－イル、ピペラジン－２－イル、ピペラジン－３－イル、ピペラジン－４－イル、ピペラジン－５－イル、ピペラジン－６－イル、モルホリニル、モルホリン－２－イル、モルホリン－３－イル、モルホリン－４－イル、モルホリン－５－イル、モルホリン－６－イル、チオモルホリニル、チオモルホリン－２－イル、チオモルホリン－３－イル、チオモルホリン－４－イル、チオモルホリン－５－イル、チオモルホリン－６－イル、オキサチアニル、オキサチアン－２－イル、オキサチアン－３－イル、オキサチアン－５－イル、オキサチアン－６－イル、ジチアニル、ジチアン－２－イル、ジチアン－３－イル、ジチアン－５－イル、ジチアン－６－イル、アゼパニル、アゼパン－１－イル、アゼパン－２－イル、アゼパン－３－イル、アゼパン－４－イル、アゼパン－５－イル、アゼパン－６－イル、アゼパン－７－イル、オキセパニル、オキセパン－２－イル、オキセパン－３－イル、オキセパン－４－イル、オキセパン－５－イル、オキセパン－６－イル、オキセパン－７－イル、チエパニル、チエパン－２－イル、チエパン－３－イル、チエパン－４－イル、チエパン－５－イル、チエパン－６－イル、チエパン－７－イル、ジオキソラニル、ジオキソラン－２－イル、ジオキソラン－４－イル、ジオキソラン－５－イル、チオキサニル、チオキサン－２－イル、チオキサン－３－イル、チオキサン－４－イル、チオキサン－５－イル、ジチオラニル、ジチオラン－２－イル、ジチオラン－４－イル、ジチオラン－５－イル、ピロリニル、ピロリン－１－イル、ピロリン－２－イル、ピロリン－３－イル、ピロリン－４－イル、ピロリン－５－イル、イミダゾリニル、イミダゾリン－１－イル、イミダゾリン－３－イル、イミダゾリン－４－イル、イミダゾリン－５－イル、イミダゾリジニル、イミダゾリジン－１－イル、イミダゾリジン－２－イル、イミダゾリジン－３－イル、イミダゾリジン－４－イル、イミダゾリジン－４－イル、ピラゾリニル、ピラゾリン－１－イル、ピラゾリン－３－イル、ピラゾリン－４－イル、ピラゾリン－５－イル、ピラゾリジニル、ピラゾリジン－１－イル、ピラゾリジン－２－イル、ピラゾリジン－３－イル、ピラゾリジン－４－イル、ピラゾリジン－５－イル、ヘキサヒドロ－１，４－ジアゼピニル、ジヒドロフラニルジヒドロピラニル、１，２，３，６－テトラヒドロピリジニル、２Ｈ－ピラニル、４Ｈ－ピラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、３－ア

ザビシクロ［３．１．０］ヘキサニル、３－アザビシクロ［４．１．０］ヘプタニル、ピロリジニル－２－オン、ピペリジニル－３－オン　ピペリジニル－２－オン、ピペリジニル－４－オン、および２Ｈ－ピロリルが含まれる。

【０１６８】

用語「置換されていてもよい」は、本明細書で使用する場合、言及している基が、非置換の基の１個または複数の水素原子の代わりに１個または複数の追加の基（複数可）で置換されていても、置換されていなくてもよいことを意味する。存在してよいそのような基の個数は、１個から非置換の基上の水素原子の個数までの範囲である。任意選択の置換基は、別段の指定がない限り、個々に、かつ独立に、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシ、メルカプチル、シアノ、ハロ、カルボニル、チオカルボニル、イソシアナト、チオシアナト、イソチオシアナト、ニトロ、ペルハロアルキル、ペルフルオロアルキル、ならびに一置換および二置換アミノ基を含めたアミノ、ならびにそれらの保護誘導体から選択される。任意選択の置換基の非限定的な例には、ハロ（特にＦ、ＣｌおよびＢｒ）、－ＣＮ、－ＯＲ、－Ｒ、－NO_2、－Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨＲ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＳＲ－、－Ｓ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$Ｒ、－ＮＨＲ、－Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｒ、－ＮＲＣ（＝Ｏ）Ｒ、－ＮＲＣ（Ｓ）Ｒ、ＮＨＣ（＝Ｏ）ＯＲ、－ＮＲＣO_2Ｒ、－ＮＲＣ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＮＲＣ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＮＲＮＲＣ（＝Ｏ）Ｒ、－ＮＲＮＲＣ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＮＲＮＲＣO_2Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、Ｓ（＝Ｏ）$_2$ＮＨＲ、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＮＨＳ（＝Ｏ）$_2$、－ＮＨＳ（＝Ｏ）$_2$Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）CH_2Ｃ（＝Ｏ）Ｒ、－Ｃ（Ｓ）Ｒ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｓ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（ＯＲ）Ｒ、－Ｃ（ＮＯＲ）Ｒ、－Ｓ（＝Ｏ）$_3$Ｒ、－ＮＲＳO_2Ｎ（Ｒ）$_2$、－ＮＲＳO_2Ｒ、－Ｎ（ＯＲ）Ｒ、－Ｃ（＝ＮＨ）－Ｎ（Ｒ）$_2$、－Ｐ（＝Ｏ）$_2$Ｒ、－ＰＯ（Ｒ）$_2$、－ＯＰＯ（Ｒ）$_2$、－（CH_2）$_{0-2}$ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｒ、Ｒで置換されていてもよいフェニル（Ｐｈ）、Ｒで置換されていてもよい－Ｏ（Ｐｈ）、Ｒで置換されていてもよい－（CH_2）$_{1\sim2}$（Ｐｈ）、Ｒで置換されていてもよい－ＣＨ＝ＣＨ（Ｐｈ）、C_1～C_6アルキル、C_1～C_6アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、ハロ置換C_1～C_6アルキル、ハロ置換C_1～C_6アルコキシが包含され、この際、各Ｒは独立に、Ｈ、C_1～C_6アルキル、C_2～C_6アルケニル、C_2～C_6アルキニル、C_1～C_6アルコキシ、アリール、ヘテロアリール、$C_{3\sim8}$シクロアルキル、$C_{3\sim8}$ヘテロシクロアルキル、ハロ置換のC_1～C_6アルキル、ハロ置換のC_1～C_6アルコキシから選択され、かつ同じ原子か、または隣接する接続原子上の２個のＲ基は、一緒になって、追加のＮ、Ｏ、またはＳを環員として含有してもよい５～６員環を形成していてよい。アルキル、シクロアルキル、およびヘテロシクロアルキル基に適した置換基にはさらに、＝ＣＨＲ、＝Ｏ（オキソ）、および＝Ｎ－Ｒが含まれ得る。アリールまたはヘテロアリール基に好ましい置換基は、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、－ＮＲ’$_2$、ヒドロキシ、C_1～C_4アルキル、C_1～C_4ハロアルキル、C_1～C_4アルコキシ、C_1～C_4ハロアルコキシ、C_1～C_4アルコキシ－C_1～C_4アルキル、－ＣＯＯＲ’、－ＣＯＮＲ’$_2$、－ＳＲ’、および－SO_2Ｒ’から選択され、この際、各Ｒ’は、ＨまたはC_1～C_4アルキルである。アルキル、シクロアルキル、またはヘテロシクロアルキル基に好ましい置換基は、オキソ（＝Ｏ）、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、－ＮＲ’$_2$、ヒドロキシ、C_1～C_4アルキル、C_1～C_4ハロアルキル、C_1～C_4アルコキシ、C_1～C_4ハロアルコキシ、C_1～C_4アルコキシ－C_1～C_4アルキル、－ＣＯＯＲ’、－ＣＯＮＲ’$_2$、－ＳＲ’、および－SO_2Ｒ’から選択され、この際、各Ｒ’は、ＨまたはC_1～C_4アルキルである。

【０１６９】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸、合成アミノ酸、および非天然アミノ酸、さらには、天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物質を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝コードによってコードされるもの、さら

には、後で修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタマート、およびＯ－ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびＲ基に結合しているα－炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、修飾されたＲ基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド主鎖を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。アミノ酸模倣物質は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

【０１７０】

用語「非天然アミノ酸」は、本明細書で使用する場合、同じか、異なるかに関わらず、いずれの生体からの非修飾または修飾遺伝子を使用しても、いずれの生体においても生合成で産生され得ないアミノ酸構造を表すことが意図されている。加えて、そのような「非天然アミノ酸」は、タンパク質への組み込みには、修飾ｔＲＮＡおよび修飾ｔＲＮＡシンテターゼ（ＲＳ）を必要とすることは理解される。これらの「選択された」直交性ｔＲＮＡ／ＲＳ対は、非天然アミノ酸に特異的であり、Schultzらによって開発されたとおりの選択プロセス（例えば、Liuら、Annu. Rev. Biochem. 79:413～444, 2010を参照されたい）または同様の手順によって生成される。用語「非天然アミノ酸」には、天然に存在する第２２番目のタンパク新生アミノ酸ピロリシン（Ｐｙｌ）、さらには、その脱メチル化類似体ピロリン－カルボキシ－リシン（Ｐｃｌ）は含まれない。それというのも、タンパク質への両方の残基の組み込みは、非修飾の天然に存在するピロリシル－ｔＲＮＡ／ｔＲＮＡシンテターゼ対によって媒介されるためである（例えば、Ouら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108:10437～10442、2011を参照されたい）。

【０１７１】

用語「抗体」は、本明細書で使用する場合、対応する抗原に非共有で、可逆的に、かつ特異的に結合することが可能な免疫グロブリンファミリーのポリペプチドを指す。例えば、天然に存在するＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続されている少なくとも２本の重（Ｈ）鎖および２本の軽（Ｌ）鎖を含むテトラマーである。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略記）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略記）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、１個のドメインC_Lからなる。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存されている領域に散在している、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性の領域にさらに細分され得る。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと次の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、およびＦＲ４で配置されている３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的相補系の第１成分（Ｃｌｑ）を含めた宿主組織または因子との結合を媒介することができる。

【０１７２】

用語「抗体」には、これらだけに限定されないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Ｉｄ抗体を含む）が含まれる。抗体は、任意のアイソタイプ／クラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、またはサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、およびＩｇＡ２）であってよい。

【０１７３】

軽鎖および重鎖は両方とも、構造的相同性および機能的相同性の領域に区分される。用語「定常」および「可変」は、機能について使用されている。この点について、軽（V_L）鎖および重（V_H）鎖部分の両方の可変ドメインが、抗原認識および特異性を決定していることは分かるであろう。逆に、軽鎖（C_L）および重鎖（ＣＨ１、ＣＨ２、またはＣ

Ｈ３）の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動性、Ｆｃ受容体結合、相補性結合などの重要な生物学的特性をもたらしている。慣例では、抗原結合部位または抗体のアミノ末端からより遠位になるほど、定常領域ドメインのナンバリングは大きくなる。Ｎ末端は可変領域であり、Ｃ末端は定常領域であり、ＣＨ３およびC_Lドメインは実際に、それぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端ドメインを含む。

【０１７４】

用語「抗体断片」は、本明細書で使用する場合、抗体の抗原結合断片または抗体の非抗原結合断片（例えば、Ｆｃ）を指す。用語「抗原結合断片」は、本明細書で使用する場合、抗原のエピトープと特異的に相互作用する能力（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布によって）を保持している抗体の１つまたは複数の部分を指す。結合断片の例には、これらだけに限定されないが、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、V_L、V_H、C_L、およびＣＨ１ドメインからなる一価断片；Ｆ（ａｂ）$_2$断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結した２個のＦａｂ断片を含む二価断片；V_HおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのV_LおよびV_HドメインからなるＦｖ断片；V_HドメインからなるｄＡｂ断片（Wardら、Nature 341:544～546、1989）；ならびに単離相補性決定領域（ＣＤＲ）、または抗体の他のエピトープ結合断片が含まれる。

【０１７５】

さらに、Ｆｖ断片、V_L、およびV_Hの２個のドメインは別々の遺伝子によってコードされるが、それらを、組換え法を使用して、V_LおよびV_H領域対が一価分子を形成している単一タンパク質鎖としてそれらが作製されることを可能にする合成リンカーによって、一緒にすることができる（単鎖Ｆｖ（「ｓｃＦｖ」）として公知；例えば、Birdら、Science 242:423～426、1988;およびHustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879～5883、1988を参照されたい）。そのような単鎖抗体はまた、用語「抗原結合断片」の範囲内に内包されることが意図されている。これらの抗原結合断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無損傷抗体と同じように有用性についてスクリーニングされる。

【０１７６】

抗原結合断片はまた、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ｖ－ＮＡＲ、およびビス－ｓｃＦｖに組み込むことができる（例えば、HollingerおよびHudson、Nature Biotechnology 23:1126～1136、2005を参照されたい）。抗原結合断片は、フィブロネクチンＩＩＩ型（Ｆｎ３）などのポリペプチドをベースとする骨格にグラフトすることができる（フィブロネクチンポリペプチドモノボディについて記載している米国特許第６，７０３，１９９号を参照されたい）。

【０１７７】

抗原結合断片は、相補性軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成しているタンデムＦｖセグメント（V_H－ＣＨ１－V_H－ＣＨ１）の対を含む単鎖分子に組み込むことができる（Zapataら、Protein Eng. 8:1057～1062、1995；および米国特許第５，６４１，８７０号）。

【０１７８】

用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書で使用する場合、実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または同じ遺伝源に由来する抗体および抗体断片を含めたポリペプチドを指す。この用語にはまた、単一分子組成の抗体分子の製剤も含まれる。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープについての単一結合特異性およびアフィニティーを示す。

【０１７９】

用語「ヒト抗体」には、本明細書で使用する場合、フレームワーク領域およびＣＤＲ領域の両方がヒト由来の配列に由来する可変領域を有する抗体が含まれる。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域はまた、そのようなヒト配列、例えば、ヒト生殖細胞

系配列もしくはヒト生殖細胞系配列の変異バージョン、または例えば、Knappikら、J. Mol. Biol. 296:57～86、2000に記載されているとおりのヒトフレームワーク配列分析に由来するコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体に由来する。

【０１８０】

本発明のヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基を含んでよい（例えば、インビトロでの無作為もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異、あるいは安定性または製造を促進するための保存的置換）。

【０１８１】

用語「ヒト化」抗体は、本明細書で使用する場合、ヒトにおける免疫原性は低いが、非ヒト抗体の反応性を保持している抗体を指す。これは、例えば、非ヒトＣＤＲ領域を保持し、かつ抗体の残りの部分をそのヒト対応部分で置き換えることによって、達成することができる。例えば、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851～6855 (1984); MorrisonおよびOi、Adv. Immunol.、44:65～92 (1988); Verhoeyenら、Science、239:1534～1536 (1988); Padlan、Molec. Immun.、28:489～498 (1991);Padlan、Molec. Immun.、31(3):169～217 (1994)を参照されたい。

【０１８２】

用語「認識する」は、本明細書で使用する場合、エピトープが直鎖または配座異性であるかに関わらず、そのエピトープを見出し、それと相互作用（例えば、結合）する抗体またはその抗原結合性断片を指す。用語「エピトープ」は、本発明の抗体または抗原結合性断片が特異的に結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、連続アミノ酸、またはタンパク質の三次折りたたみにより近接して並ぶ不連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは典型的には、変性溶媒に曝露しても保持されるのに対して、三次元折りたたみにより形成されるエピトープは典型的には、変性溶媒での処理によって失われる。エピトープは典型的には、独特の空間立体構造内に少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５アミノ酸を含む。エピトープの空間立体構造を決定する方法には当技術分野の技法、例えば、Ｘ線結晶学および二次元核磁気共鳴が含まれる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、Vol. 66、G. E. Morris編(1996)を参照されたい）。

【０１８３】

用語「アフィニティー」は、本明細書で使用する場合、単一抗原部位における抗体と抗原との相互作用の強度を指す。各抗原部位内において、抗体の可変領域「アーム」は、弱い非共有結合力を介して、抗原と多数の部位において相互作用し；相互作用が強いほど、アフィニティーは強い。

【０１８４】

用語「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す。しかしながら、１種の抗原に特異的に結合する単離抗体は、交差反応性を他の抗原に対して有することがある。さらに、単離抗体は、他の細胞物質および／または薬品を実質的に含まなくてよい。

【０１８５】

用語「保存的に修飾されたバリアント」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関しては、保存的に修飾されたバリアントは、同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を、またはアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝コードの縮重によって、多数の機能的に同一の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、およびＧＣＵはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによってアラニンが指定されるどの位置でも、コードされるポリペプチドを変更することなく、コドンを、記載した対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変形は、「サイレントバリエーション（silent variations）」であり、保存的に修飾された変形の１種である。ポリペプチドをコードする本明細書に記載のいずれの核酸配列も、可能性の

あるすべての核酸のサイレントバリエーションを記載している。当業者であれば、核酸中の各コドン（ただし、通常はメチオニンのための唯一のコドンであるＡＵＧ、および通常はトリプトファンのための唯一のコドンであるＴＧＧは除外する）を、機能的に同一の分子が得られるように修飾することができることは分かるであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレントバリエーションが、記載した各配列において暗に示されている。

【０１８６】

ポリペプチド配列については、「保存的に修飾されたバリアント」には、化学的に同様のアミノ酸でのアミノ酸の置換が結果として生じるポリペプチド配列に対する個々の置換、欠失、または付加が含まれる。機能的に同様のアミノ酸をもたらす保存的置換の表は、当技術分野で周知である。そのような保存的に修飾されたバリアントは、多形バリアント、種間相同体、および本発明の対立遺伝子に対する追加であって、それらを排除するものではない。次の８つの群は、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；４）アルギニン（Ｒ）、リシン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；７）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；および８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい）。一部の実施形態では、用語「保存的配列修飾」は、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意な影響を及ぼさないか、またはそれを変更しないアミノ酸修飾を指すために使用されている。

【０１８７】

用語「最適化」は、本明細書で使用する場合、ヌクレオチド配列が、産生細胞または生体、一般に真核細胞、例えば、酵母細胞、ピチア（Pichia）細胞、真菌細胞、トリコデルマ（Trichoderma）細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、またはヒト細胞において好ましいコドンを使用して、アミノ酸配列をコードするように変更されていることを指す。最適化ヌクレオチド配列は、「親」配列としても知られている出発ヌクレオチド配列によって本来コードされるアミノ酸配列を完全に、または可能な限り多く、保持するように操作されている。

【０１８８】

２つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における用語「パーセント同一」または「パーセント同一性」は、同じである２種以上の配列または部分配列を指す。下記の配列比較アルゴリズムのうちの１つを使用して、または手動アラインメントおよび目視検査によって測定して、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって最大限一致するように比較し、アラインさせた場合に、２つの配列が同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドの指定パーセンテージ（すなわち、指定の領域にわたって、または指定されていない場合には、配列全体にわたって６０％同一性、任意選択により６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一性）を有する場合に、その２つの配列は「実質的に同一」である。任意選択により、同一性は、少なくとも約５０ヌクレオチド（または１０アミノ酸）長である領域にわたって、またはより好ましくは、１００～５００または１０００以上のヌクレオチド（または２０、５０、２００以上のアミノ酸）長である領域にわたって存在する。

【０１８９】

配列比較では典型的には、１つの配列が基準配列として機能し、その基準配列に対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験および基準配列をコンピュータに入力し、必要であればサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用することができるか、または代替パラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムが、プロプラムパラメータに基づいて、基準配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を計算する。

【０１９０】
「比較ウィンドウ」は、本明細書で使用する場合、２０～６００、一般的には約５０～約２００、より一般的には約１００～約１５０からなる群から選択される数の連続した位置のうちの任意の１つのセグメントに対する基準を含み、この際、配列を、２つの配列を最適にアラインさせた後に、同一数の連続した位置の基準配列と比較することができる。比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2:482c (1970)の局所的相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似度検索により、これらのアルゴリズムのコンピュータ処理による実行（the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ）により、または手動アラインメントおよび目視検査（Brentら、Current Protocols in Molecular Biology, 2003を参照されたい）により、行うことができる。

【０１９１】
パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適したアルゴリズムの２つの例は、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ　２．０アルゴリズムであり、これらは、Altschulら、Nuc. Acids Res. 25:3389～3402、1977；およびAltschulら、J. Mol. Biol. 215:403～410、1990にそれぞれ記載されている。ＢＬＡＳＴ解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを介して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインさせた場合に、一部の正の値の閾値スコアＴにマッチまたは適合するクエリー配列中の長さＷの短いワードを同定することによって、高スコア配列対（high scoring sequence pairs；ＨＳＰ）を同定することを伴う。Ｔは、隣接ワードスコア閾値と称される（Altschulら、前出）。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むさらに長いＨＳＰを発見する検索を開始するためのシード配列として機能する。このワードヒットは、累積アラインメントスコアが上昇し得る限り、各配列に沿って両方向に延長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータＭ（一対のマッチ残基のリワードスコア（reward score）；常に＞０）およびＮ（ミスマッチ残基のペナルティースコア；常に＜０）を使用して計算される。アミノ酸配列については、累積スコアを計算するためにスコアリングマトリックスが使用される。累積アラインメントスコアが、その達成される最大値から量Ｘだけ減少した時に；１つもしくは複数の負のスコアの残基アラインメントの蓄積のために、累積スコアが０以下になった時に；またはいずれかの配列の末端に到達した時に、各方向でのワードヒットの延長は止まる。ＢＬＡＳＴアルゴリズムパラメータＷ、Ｔ、およびＸは、アラインメントの感度および速度を決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列では）は、デフォルトとして、１１のワード長（Ｗ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列では、ＢＬＡＳＴＰプログラムは、デフォルトとして、３のワード長、および１０の期待値（Ｅ）を使用し、ＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックス（HenikoffおよびHenikoff、(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照されたい）は、５０のアラインメント（Ｂ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、および両鎖の比較を使用する。

【０１９２】
ＢＬＡＳＴアルゴリズムは、２つの配列間の類似性の統計的解析も行う（例えば、KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873～5787、1993を参照されたい）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムが提供する類似性の尺度の１つは、最小合計確率（Ｐ（Ｎ））であり、これは、２つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間での一致が偶然に生じる確率の指標を提供する。例えば、試験核酸を基準核酸と比較して、最小合計確率が約０．２未満、より好ましくは約０．０１未満、最も好ましくは約０．００１未満であると、核酸は基準配列に類似するとみなされる。

【０１９３】
２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれていて、ＰＡＭ１２０重量残基表、１２のギャップ長ペナルティー、および４のギャップペナルティーを用いるE. MeyersおよびW. Miller、Comput. Appl. Biosci. 4:11～17、1988）のアルゴリズムを使用して決定することもできる。加えて、２つのアミノ酸配列の間でのパーセント同一性は、ＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラム（ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手可能）に組み込まれていて、Ｂｌｏｓｓｏｍ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれかならびに１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップの重みおよび１、２、３、４、５、または６の長さの重みを使用するNeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48:444～453、1970）のアルゴリズムを使用して決定することができる。
【０１９４】
上述の配列同一性のパーセンテージ以外に、２つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であるという別の指標は、第１の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に記載するとおり、第２の核酸によってコードされるポリペプチドに対する抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、例えば、２つのペプチドが、保存的置換によってのみ異なる場合には、ポリペプチドは典型的には、第２のポリペプチドと実質的に同一である。２つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指標は、２つの分子またはそれらの補体が、下記に記載するとおりのストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。２つの核酸配列が実質的に同一であるというさらに別の指標は、同じプライマーを使用して、配列を増幅することができることである。
【０１９５】
用語「核酸」は、本明細書では、用語「ポリヌクレオチド」と互換的に使用されており、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、または一本鎖型もしくは二本鎖型のそれらのポリマーを指す。この用語は、基準核酸と同様の結合特性を有し、基準ヌクレオチドと同様に代謝される合成、天然に存在する、および天然に存在しない既知のヌクレオチド類似体または修飾主鎖残基もしくは連結を含有する核酸を内包する。そのような類似体の例には、限定ではないが、ホスホロチオアート、ホスホロアミダート、メチルホスホナート、キラル－メチルホスホナート、２－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ペプチド－核酸（ＰＮＡ）が含まれる。
【０１９６】
別段に示さない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾されたバリアント（例えば、変質コドン置換体）および相補的配列、さらには明示された配列を暗に内包する。具体的には、下記で詳述するとおり、変質コドン置換体は、１つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第３位が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基と置換されている配列を生成することによって達成され得る（Batzerら、(1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsukaら、(1985) J. Biol. Chem. 260:2605～2608;およびRossoliniら、(1994) Mol. Cell. Probes 8:91～98）。
【０１９７】
核酸の文脈における用語「作動可能に連結している」は、２つ以上のポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ）セグメント間の機能的関係性を指す。典型的には、これは、転写調節配列と転写配列との機能的関係性を指す。例えば、適切な宿主細胞または他の発現系においてコード配列の転写を刺激またはモジュレートするならば、プロモーターまたはエンハンサー配列は、コード配列に実施可能に連結している。一般に、転写配列に実施可能に連結しているプロモーター転写調節配列は、転写配列に物理的に連続している、すなわち、それらはシス作用性である。しかしながら、エンハンサーなどの一部の転写調節配列は、物理的に連続していること、または転写を増強するコード配列に近接して設置されていることを必要としない。
【０１９８】
用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために

本明細書では互換的に使用される。これらの用語は、１個または複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的模倣物質であるアミノ酸ポリマー、さらには、天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに当てはまる。別段に示さない限り、特定のポリペプチド配列は、その保存的に修飾されたバリアントも暗に内包する。

【０１９９】

用語「免疫コンジュゲート」または「抗体コンジュゲート」は、本明細書で使用する場合、抗体またはその抗体断片と、化学療法薬、毒素、免疫治療薬、イメージングプローブ、分光学的プローブなどの別の薬剤との連結を指す。連結は、共有結合、または静電力を介するような非共有相互作用であってよい。免疫コンジュゲートを形成するために、当技術分野で公知の様々なリンカーを使用することができる。加えて、免疫コンジュゲートを、免疫コンジュゲートをコードするポリヌクレオチドから発現され得る融合タンパク質の形態で提供することができる。本明細書で使用する場合、「融合タンパク質」は、別々のタンパク質（ペプチドおよびポリペプチドを含む）を本来はコードする２つ以上の遺伝子または遺伝子断片をつなぐことによって創製されるタンパク質を指す。融合遺伝子の翻訳の結果として、本来のタンパク質それぞれに由来する機能特性を有する単一のタンパク質が生じる。

【０２００】

用語「対象」には、ヒトおよび非ヒト動物が含まれる。非ヒト動物には、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、および爬虫類などの哺乳動物および非哺乳動物が含まれる。示されている場合を除いて、用語「患者」または「対象」は、本明細書では互換的に使用される。

【０２０１】

用語「細胞毒」または「細胞傷害性薬」は、本明細書で使用する場合、細胞の成長および増殖に有害であり、細胞または悪性疾患を低減、阻害、または破壊するように作用し得る任意の薬剤を指す。

【０２０２】

用語「抗癌薬」は、本明細書で使用する場合、これらだけに限定されないが、細胞傷害性薬、化学療法薬、放射線療法および放射線治療薬、標的化抗癌薬、ならびに免疫治療薬を含めた、癌などの細胞増殖性障害を治療するために使用することができる任意の薬剤を指す。

【０２０３】

用語「末端基（ＴＧ）」は、本明細書で使用する場合、本発明の抗体または抗体断片とコンジュゲートする化学的部分または表面を指す。例えば、末端基は、抗癌薬、抗炎症薬、抗真菌薬、抗菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、麻酔薬から選択される薬物部分であってよい。ある特定の実施形態では、薬物部分は、Ｖ－ＡＴＰアーゼ阻害薬、ＨＳＰ９０阻害薬、ＩＡＰ阻害薬、ｍＴｏｒ阻害薬、微小管安定薬、微小管不安定化薬、オーリスタチン、ドラスタチン、マイタンシノイド、ＭｅｔＡＰ（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質ＣＲＭ１の核外輸送の阻害薬、ＤＰＰＩＶ阻害薬、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害薬、タンパク質合成阻害薬、キナーゼ阻害薬、ＣＤＫ２阻害薬、ＣＤＫ９阻害薬、プロテアソーム阻害薬、ＲＮポリメラーゼ阻害薬、Ｅｇ５阻害薬、ＨＤＡＣ阻害薬、ＤＮＡ損傷薬、ＤＮＡアルキル化薬、ＤＮＡインターカレーター、ＤＮＡ小溝結合薬、およびＤＨＦＲ阻害薬から選択される。適切な例には、ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦなどのオーリスタチン；ガンマーカリチアマイシンなどのカリチアマイシン；ならびにＤＭ１およびＤＭ４などのマイタンシノイドが含まれる。これらのそれぞれを、本発明の抗体および方法と適合性のリンカーと結合させるための方法は、当技術分野で公知である。例えば、Singhら、Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols、vol. 525、445～457 (2009)を参照されたい。加えて、末端基は、生物物理学的プローブ、フルオロフォア、スピン標識、赤外プローブ、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、スピン標識、ＤＮ

Ａ、ＲＮＡ、タンパク質、ペプチド、表面、抗体、抗体断片、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、または多糖であってよい。末端基が表面である実施形態では、そのような固体支持体には、これらだけに限定されないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが含まれる。

【０２０４】

「腫瘍」は、悪性または良性に関わらず、新生細胞の成長および増殖、ならびにすべての前癌性および癌性の細胞および組織を指す。

【０２０５】

用語「抗腫瘍活性」は、腫瘍細胞の増殖速度、生存力、または転移活性を低減することを意味する。抗腫瘍活性を示す可能な方法は、療法の間に起きる異常な細胞の成長速度の下落または腫瘍サイズ安定性もしくは縮小を示すことである。そのような活性は、これらだけに限定されないが、異種移植モデル、同種移植モデル、ＭＭＴＶモデル、および抗腫瘍活性を調査するために当技術分野で公知の他の公知のモデルを含めた認められているインビトロまたはインビボ腫瘍モデルを使用して評価することができる。

【０２０６】

用語「悪性疾患」は、非良性腫瘍または癌を指す。本明細書で使用する場合、用語「癌」には、調節解除されているか、または制御から逸脱した細胞成長によって特徴付けられる悪性疾患が含まれる。例示的な癌には、癌腫、肉腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

【０２０７】

用語「癌」には、原発性悪性腫瘍（例えば、その細胞が、元の腫瘍の部位以外の対象の身体部位へと移動していないもの）および続発性悪性腫瘍（例えば、元の腫瘍の部位とは異なる二次的部位へと腫瘍細胞が転移、遊走することから生じるもの）が含まれる。

【０２０８】

ペプチドタグを抗体に挿入する文脈における用語「挿入」は、ペプチドタグを抗体の２個の特定の残基間に組み込むことを意味する。抗体残基の総数は、挿入されたタグ残基の数だけ増加する。

【０２０９】

ペプチドタグを抗体に組み込む文脈における用語「グラフトすること」は、変異誘発によって抗体にペプチドタグを組み込むことを指す。例えば、非ＣＤＲループ内の短いアミノ酸残基ストレッチを、ペプチド配列によって置換する。この場合、抗体の残基の総数は変わらないままである。一部の実施形態では、用語「グラフトすること」はまた、ペプチドタグ残基の置換および挿入の組合せを内包する。例えば、ペプチドタグの一部を、構造的ループ残基の置換によって組み込む一方で、残りの部分は、非ＣＤＲループの特定の残基間に挿入する。ＩｇＧ抗体の残基の総数は、タグ残基の数未満の数だけ増加する。

【図面の簡単な説明】

【０２１０】

【図１】ＡＤＣの４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ（ＰＰＴアーゼ）媒介性生成の模式図である。

【図２－１】翻訳後４’－ホスホパンテテイニル化によって部位特異的抗体標識用のペプチドタグを含有するＩｇＧ１構築物の設計である。（Ａ）ＩｇＧ１構築物は、V_H、ＣＨ１、およびＣＨ３ドメインにペプチドタグ（下線付き）を含有する。（Ｂ）ＩｇＧ１構築物は、ＣＨ３、V_L、およびC_Lドメインにペプチドタグ（下線付き）を含有する。成功裏にクローニングされた設計構築物は、左側の欄にプラス（＋）の印でマーキングされている。不成功のクローニングは、マイナス（－）の印で示されている。成功裏にクローニングされた構築物は、非エクスプレッサー（－）およびエクスプレッサー（＋）（中央の欄）として分類されている。ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質（アセチルＣｏＡ基質を配列番号２８、１０５、１１８、１２０、１２３、および１２６のために使用した）が存在する状態で、何らかの検出可能なＳｆｐ触媒産物形成を示さないエクスプレッサーは、右の欄

にマイナス（－）印でマーキングされている。個々のＭＣ－ＭＭＡＦ　ＡＤＣの非常に低いが、検出可能な形成は、プラス（＋）の印で示されている。有意により効率的ではあるが、非定量的なＭＣ－ＭＭＡＦ　ＡＤＣ形成は、二重のプラス（＋＋）の印で示されている。定量的に生成された、２個の末端基（ＴＧ）を有するＭＣ－ＭＭＡＦは、三重のプラス（＋＋＋）の等級で分類されている（ＨＰＬＣ分析による）。図２（Ａ）および図２（Ｂ）に開示されている残基位置は、各配列についてのＥｕナンバリングシステムによる対応する配列番号の指示「残基」である。図２（Ａ）は、それぞれすべて、出現順に、配列番号１１３０の残基１～６８、配列番号９４の残基１～８０、配列番号９５の残基１～７９、配列番号９６の残基１～８０、配列番号１１３０の残基１～７２、配列番号９９の残基１～８０、配列番号９７の残基１～７９、配列番号９８の残基１～７７、配列番号１１３０の残基１２２～１９８、配列番号１００の残基１～７７、配列番号１０２の残基１～７７、配列番号１０１の残基１～７７、配列番号１０５の残基１～７７、配列番号１０７の残基１～７７、配列番号１１３０の残基１２２～１９０、配列番号１０８の残基１～７６、配列番号１０３の残基１～７５、配列番号１０６の残基１～７４、配列番号１１３０の残基１６４～２３１、配列番号１１８の残基４３～１１５、配列番号１１０の残基４３～１１５、配列番号１１３の残基４３～１１４、配列番号１１３０の残基１６４～２４０、配列番号１１９の残基４３～１１９、配列番号１０９の残基４３～１１９、配列番号１１２の残基４３～１１９、配列番号１１１の残基４３～１１９、配列番号１１４の残基４３～１１９、配列番号１１５の残基４３～１１９、配列番号１１６の残基４３～１１９、配列番号１１７の残基４３～１１９、配列番号１１３０の残基３２４～４００、配列番号１２３の残基２０３～２７９、および配列番号１２０の残基２０３～２７９を開示している。図２（Ｂ）は、それぞれすべて、出現順に、配列番号１１３０の残基３２４～３８８、配列番号１２２の残基２０３～２７８、配列番号１２１の残基２０３～２７９、配列番号１１３０の残基３７３～４４９、配列番号１２４の残基２５２～３２８、配列番号１２５の残基２５２～３２８、配列番号１３５の残基２５２～３２８、配列番号１３７の残基２５２～３２８、配列番号１３８の残基２５２～３２８、配列番号１１３０の残基３７３～４４４、配列番号１３４の残基２５２～３２８、配列番号１１３０の残基３９０～４４９、配列番号１２７の残基２６９～３４０、配列番号１２６の残基２６９～３３５、配列番号１２９の残基２６９～３３９、配列番号１３１の残基２６９～３３７、配列番号１３０の残基２６９～３３８、配列番号１３２の残基２６９～３４０、配列番号１３６の残基２６９～３４０、配列番号１１３０の残基３８３～４４９、配列番号１４０の残基２６２～３４１、配列番号１３９の残基２６２～３４０、配列番号１４１の残基２６２～３４０、配列番号１１３１の残基１～６８、配列番号２６の残基１～８０、配列番号２７の残基１～７９、配列番号１１３１の残基７６～１５２、配列番号３０の残基７６～１６０、配列番号１１３１の残基１５０～２１４、配列番号２９の残基４２～１１７、および配列番号２８の残基４２～１１８を開示している。

【図２－２】（図２－１の続き）

【図２－３】（図２－２の続き）

【図２－４】（図２－３の続き）

【図２－５】（図２－４の続き）

【図２－６】（図２－５の続き）

【図３】（Ａ）Ｉｇγ１重鎖のＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、およびヒンジ領域の配列（配列番号９３）である。（Ｂ）Ｉｇκ軽鎖のC_Lドメインの配列（配列番号２４）。下線付きのアミノ酸は構造的ループである。アミノ酸位置は、Edelmanら、Proc. Natl. Acad. USA 63:78～85(1969)に記載されているとおりのＥｕナンバリングシステムによってナンバリングされている。X'_1、X'_2、X'_3、X'_4、X'_5、およびX'_6は、ＩｇＧ１サブクラスおよびκアイソタイプ内のアロタイプ位置に存在する残基を示している（Jefferisら、MAbs. 1:332～338(2009)による）。

【図４－１】（Ａ）トラスツズマブを伴う４種のヒトＩｇγサブクラスのＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、およびヒンジ領域の配列アラインメント（それぞれ

出現順に、配列番号１１０９～１１１３）である。（Ｂ）トラスツズマブを伴うＣ$_{L}$ドメインの配列アラインメント（それぞれ出現順に、配列番号１１１４～１１１５）である。下線付きの残基は構造的ループに属する（図３も参照されたい）。四角で囲まれた残基は、Jefferisら、MAbs. 1:332～338(2009)によって、アロタイプの位置を示している。単純にするために、ＩｇＧ１サブクラスおよびκアイソタイプ内のアロタイプ位置のみが示されている。ヒトＩｇγサブクラスおよびヒトκアイソタイプのタンパク質配列は、ＵｎｉＰｒｏｔデータベース（エントリー番号Ｐ０１８５７、Ｐ０１８５９、Ｐ０１８６０、Ｐ０１８６１、およびＰ０１８３４）に由来する。

【図４－２】（図４－１の続き）

【図４－３】（図４－２の続き）

【図５－Ａ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ａ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１１７）のほぼ定量的な形成が確認される。

【図５－Ｂ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｂ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）のほぼ定量的な形成が確認される。

【図５－Ｃ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｃ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ３（配列番号１１１９）のほぼ定量的な形成が確認される。

【図５－Ｄ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｄ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３（配列番号１１２０）の定量的形成が確認される。

【図５－Ｅ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｅ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬ－Ｎ３８９（配列番号１１２１）のほぼ定量的な形成が確認される。

【図５－Ｆ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｆ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１１２２）の定量的形成が確認される。

【図５－Ｇ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｇ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲートｍＡｂ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１２３）のほぼ定量的な形成が確認される。

【図５－Ｈ】Ｓｆｐ触媒ＡＤＣ形成のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｈ）ＨＰＬＣトレースによって、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ－Ｉ２－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ３（配列番号１１２４）の部分的形成が例証される。

【図６－１】分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ＡｎＳＥＣ）による３種のトラスツズマブ免疫コンジュゲートの特徴付けによって、モノマーの非凝集ＡＤＣの形成を例証する。（Ａ）免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３（配列番号１１２０）のＡｎＳＥＣ分析。（Ｂ）免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１１２２）のＡｎＳＥＣ分析。

【図６－２】分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ＡｎＳＥＣ）による３種のトラスツズマブ免疫コンジュゲートの特徴付けによって、モノマーの非凝集ＡＤＣの形成を例証する。（Ｃ）免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬ－Ｎ３８９（配列番号１１２１）のＡｎＳＥＣ分析。

【図７】特定の位置にペプチドタグを組み込むことでのトラスツズマブの標識の失敗のＨＰＬＣ特徴付けである。ＨＰＬＣトレースは、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｓ１９０Ｄ－Ｓ１９１－Ｓ１９２Ｌ－Ｌ１９３Ｅ－Ｇ１９４Ｆ－Ｔ１９５Ｉ－Ｑ１９６Ａ－Ｔ１９７Ｓ－Ｙ１９８Ｋ－Ｉ１９９Ｌ（配列番号１１４）とＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦとのコンジュゲーションがないことを表示している。

【図８－Ａ】ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦでの混合グラフト／挿入構築物の標識のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ａ）ＨＰＬＣトレースは、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｓ６３－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－Ｖ６４Ｌ－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｋ６５（配列番号１１２５）の部分的形成を表示している。

【図８－Ｂ】ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦでの混合グラフト／挿入構築物の標識のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｂ）ＨＰＬＣトレースは、免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ－Ｓ７６Ｄ－Ｓ７７－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－Ｌ７８－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ７９（配列番号１１２６）の形成がないことを表示している。

【図９－Ａ】ＩｇＧへのフルオロフォア結合のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ａ）ＨＰＬＣトレースによって、抗体－フルオロフォアコンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｐ１８９Ｇ－Ｓ１９０Ｄ－Ｓ１９１－ｐｐａｎ－マレイミドエチルアミド－ＴＭＲ－Ｓ１９２Ｌ－Ｌ１９３Ｓ－Ｇ１９４Ｗ－Ｔ１９５Ｌ（配列番号１１２７）のほぼ定量的な形成が確認される。２８０および５５５ｎｍでモニタリングされたＨＰＬＣトレース間の広範な重複は、ほぼ定量的なフルオロフォアコンジュゲーションを表示している。

【図９－Ｂ】ＩｇＧへのフルオロフォア結合のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｂ）ＨＰＬＣトレースによって、抗体－フルオロフォアコンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－マレイミドエチルアミド－ＴＭＲ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１２８）のほぼ定量的な形成が確認される。２８０および５５５ｎｍでモニタリングされたＨＰＬＣトレース間の広範な重複は、ほぼ定量的なフルオロフォアコンジュゲーションを表示している。

【図１０－Ａ】加水分解マレイミド－またはブロモアセチルチオエーテル－連結細胞毒での抗体標識のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ａ）ＨＰＬＣトレースによって、マレイミド－開環ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）とのほぼ定量的なコンジュゲーションが確認される。

【図１０－Ｂ】加水分解マレイミド－またはブロモアセチルチオエーテル－連結細胞毒での抗体標識のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｂ）ＨＰＬＣトレースによって、ＣｏＡ－Ａｃ－Ａｈｘ－ＭＭＡＦと抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）とのほぼ定量的なコンジュゲーションが確認される。

【図１１－Ａ】切断可能なリンカーを介して接続させた細胞毒での抗体標識のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ａ）ＨＰＬＣトレースによって、ＣｏＡ－ＭＣ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦと抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）とのほぼ定量的なコンジュゲーションが確認される。

【図１１－Ｂ】切断可能なリンカーを介して接続させた細胞毒での抗体標識のＨＰＬＣ特徴付けである。（Ｂ）ＨＰＬＣトレースによって、ＣｏＡ－ＭＣ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦと抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）とのほぼ定量的なコンジュゲーションが確認される。

【図１２】ｐＨの関数とした４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ（ＰＰＴアーゼ）触媒ＡＤＣ形成の最適化を示す。棒グラフ表示は、ｐＨの関数として、２の薬物対抗体比（ＤＡＲ）で生成したＡＤＣの量を示している。データは、５．０～１０．０のｐＨ範囲でのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）または抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）のいずれかとの反応のＨＰＬＣ分析（２８０ｎｍ）に基づく。

【図１３－Ａ】２．５μＭ抗体、５０μＭ　ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ、および１０ｍＭ $MgCl_2$ を含有する５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）（３７℃、１６時間）

中のＳｆｐ酵素濃度の関数とした、コンジュゲーション反応の最適化を示す。（Ａ）脱重畳質量スペクトルは主に、０．１μＭのＳｆｐ濃度での非コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）を表示している。

【図１３－Ｂ】２．５μＭ抗体、５０μＭ　ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ、および１０ｍＭ$MgCl_2$を含有する５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）（３７℃、１６時間）中のＳｆｐ酵素濃度の関数とした、コンジュゲーション反応の最適化を示す。（Ｂ）脱重畳質量スペクトルは、０．２５μＭのＳｆｐ濃度での抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）のほぼ定量的なＡＤＣ形成を表示している。

【図１３－Ｃ】２．５μＭ抗体、５０μＭ　ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ、および１０ｍＭ$MgCl_2$を含有する５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）（３７℃、１６時間）中のＳｆｐ酵素濃度の関数とした、コンジュゲーション反応の最適化を示す。（Ｃ）脱重畳質量スペクトルは、０．５μＭのＳｆｐ濃度での抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）のほぼ定量的なＡＤＣ形成を表示している。

【図１４－Ａ】ｐＨ８．０でＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質濃度の関数とした、酵素的コンジュゲーション反応の最適化を示す。（Ａ）ＨＰＬＣトレースは、２．５μＭ（一番上のトレース）、７．５μＭ（中央のトレース）、または２５μＭ（一番下のトレース）のＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦを含有する２．５μＭ抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）との３つのコンジュゲーション反応を表している。４．９分の保持時間でのピークは、未標識の抗体（ＤＡＲ＝０）に対応し、５．３分でのピークは、一標識抗体（ＤＡＲ＝１）に対応し、５．７分でのピークは、二標識抗体（ＤＡＲ＝２）に対応する。

【図１４－Ｂ】ｐＨ８．０でＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質濃度の関数とした、酵素的コンジュゲーション反応の最適化を示す。（Ｂ）棒グラフ表示は、ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質濃度の関数として、２のＤＡＲを有する生成ＡＤＣの量を示している。一連の滴定タイトレーションを、０．２５μＭ（黒色の棒）または１．０μＭ（白色の棒）のいずれかのＳｆｐ酵素濃度で行った。

【図１５】ＳＹＰＲＯ　Ｏｒａｎｇｅゲル染色液を使用する示差走査蛍光分析（ＤＳＦ）によって測定したとおりのペプチドタグ付きＡＤＣの熱安定性を示す。（Ａ）免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１１７）の熱安定性の決定。摂氏６８．５度および８１．５度の２つの遷移温度がＤＳＦによって観察される（２回の計測の平均）。（Ｂ）免疫コンジュゲート抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）の熱安定性の決定。摂氏６６．３度および８１．０度の２つの遷移温度がＤＳＦによって観察される（１回の測定）。（Ｃ）ペプチドタグ付きＡＤＣと比較するための基準として使用された未修飾トラスツズマブＩｇＧ１（抗ｈＨＥＲ２）の熱安定性の決定。摂氏６９．７度および８１．１度の２つの遷移温度がＤＳＦによって観察される（２回の測定の平均）。

【図１６】２種のペプチドタグ付きトラスツズマブ免疫コンジュゲートの薬物動態（ＰＫ）研究を示す。両方のＡＤＣの血漿力価を、個々の免疫コンジュゲートをプレートに吸収させたヒトＨＥＲ２（細胞外ドメイン３～４）で捕捉し、続いて、抗ヒトＩｇＧおよび抗ＭＭＡＦ抗体で検出することによって決定した。（Ａ）ＥＬＩＳＡによる抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１１７）および未修飾トラスツズマブ（抗ｈＨＥＲ２）抗体の血漿力価の比較。免疫コンジュゲートの血漿力価は、４日以内の迅速な減衰を示す。（Ｂ）ＥＬＩＳＡによる抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）および未修飾トラスツズマブ（抗ｈＨＥＲ２）抗体の血漿力価の比較。免疫コンジュゲートの血漿力価は、１４日間以内は、未修飾の抗ｈ

ＨＥＲ２抗体の対象力価と密に平行する。
【図１７】ＨＥＲ２発現性ＭＤＡ－２３１細胞系を使用しての、ペプチドタグ付き免疫コンジュゲートのインビトロ細胞殺滅アッセイを示す。プロットは、Ｃｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用しての細胞生存性測定に基づく。図は、それぞれ配列番号１１１７、１１１８、１１０８、および１１０７の「抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０」、「抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９」、「抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＶａｌＣｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０」、および「抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＶａｌＣｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９」を開示している。
【図１８】ＩｇＧ抗体熱安定性に対する、ペプチドタグ挿入部位の影響を示すプロットである。ＳＹＰＲＯ　Ｏｒａｎｇｅゲル染色液を使用する示差走査蛍光分析（ＤＳＦ）によれば、第１の遷移温度（Ｔｍ１）は、Ｆｃ領域のＣＨ２ドメイン（アミノ酸残基２２８～３４０）にペプチドタグ挿入を含有する抗体では有意に低下する。それとは逆に、Ｆａｂ領域のＣＨ１ドメインへのペプチドタグ挿入は抗体骨格を、Ｔｍ１値が一般に、６９．７℃のＴｍ１を有する未修飾トラスツズマブＩｇＧ１よりも摂氏３度以下低いかなりわずかな程度で不安定化する。
【図１９－Ａ】４のＤＡＲを有するＡＤＣの酵素による生成を示す。（Ａ）４のＤＡＲを有するＡＤＣは、ｙｂｂＲタグおよびＳ６タグなどの複数のペプチドタグを抗体に組み込むことによって生成することができる。
【図１９－Ｂ】４のＤＡＲを有するＡＤＣの酵素による生成を示す。（Ｂ）ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと、$Ｖ_{Ｈ}$ドメインにＳ６タグおよびＣＨ３ドメインにｙｂｂＲタグを含有するトラスツズマブＩｇＧ（抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３－Ｅ３８８－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１４２））とのＳｆｐ触媒コンジュゲーションのＨＰＬＣ分析。１μＭ　Ｓｆｐ酵素が存在する状態で、２．５μＭ抗体および５０μＭ　ＣｏＡ基質を室温でインキュベーションすることで、４のＤＡＲを有するＡＤＣのほぼ定量的な形成につながる（$ｔ_{Ｒ}$＝６．１分、下方のトレース）。上方のトレースは、対応する脱共役抗体（ＤＡＲ＝０、$ｔ_{Ｒ}$＝５．２分）を表している。
【図２０－１】高ＡＵＣ　ＩｇＧ値および低ＡＵＣ　ＩｇＧ値を示すペプチドタグ付きトラスツズマブ免疫コンジュゲートの薬物動態プロファイルである。配列番号２４８（Ａ）、配列番号３３（Ｂ）、配列番号２５１（Ｃ）、配列番号２１８（Ｄ）、配列番号２０２（Ｅ）、および配列番号２４４（Ｆ）に対応する６種のペプチドタグ付きＡＤＣのそれぞれを、１ｍｇ／ｋｇの単回用量で、３匹のマウスに静脈内投与した。３４０時間にわたって血漿試料を収集した後に、ヒトＨＥＲ２の固定化細胞外ドメインを使用することによって、トラスツズマブＡＤＣ分子を捕捉した。次いで、抗ＭＭＡＦまたは抗ｈＩｇＧ抗体のいずれかに基づく２つのＥＬＩＳＡフォーマットによって、血漿力価を決定した。第１のフォーマットが、「無損傷」ＡＤＣの濃度についての読み出しを提供する一方で、後者のフォーマットは、コンジュゲートトラスツズマブ分子および非コンジュゲートトラスツズマブ分子の両方を含む、全ＩｇＧの濃度に比例したシグナルを生成する。Ａ～Ｃは、高いＡＵＣ　ＩｇＧ値を示すペプチドタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣのＰＫ曲線を例示しているのに対して、Ｄ～Ｆは、非常に低いＡＵＣ　ＩｇＧ値を示す免疫コンジュゲートの例を示している。すべての場合に、抗ＭＭＡＦおよび抗ｈＩｇＧ力価は互いに密に平行し、その際、ＰＫ研究の時間経過の間に、ＭＭＡＦペイロードの無視できる脱コンジュゲーションを示す。
【図２０－２】（図２０－１の続き）
【図２０－３】（図２０－２の続き）
【図２１】８６ペプチドタグ付きＡＤＣの抗ＭＭＡＦおよび抗ｈＩｇＧ力価間の相関を示す。このプロットによれば、全ＩｇＧおよび「無損傷」ＡＤＣの濃度読み出しは、互いに

密に一致し、そのことによって、ＭＭＡＦペイロードおよびペプチドタグ付き抗体との間の高度に安定なｐｐａｎ－ＭＣ連結が示唆されている。インビボでのＭＭＡＦ薬物の無視できる脱コンジュゲーションの他に、この高度に直線的な相関は、共有結合によるペイロードの結合が、免疫コンジュゲートの薬物動態プロファイルに負の影響を及ぼさないことも示している。

【図２２】オキシムライゲーションによって末端基（ＴＧ）を後で結合させるための、カルボニル官能化ＣｏＡ類似体でのＡ１タグ付き抗体の翻訳後修飾を伴う２ステップ法を示す。第１のステップでは、細胞培地中で、Ａ１タグ付き抗体をケトン－またはアルデヒド－官能化ＣｏＡ類似体で部位特異的に標識する。タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーの後に、ｐｐａｎ部分のカルボニル基をアミノオキシ誘導体化ＴＧと反応させる。

【図２３】ヒト腫瘍細胞系を移植された免疫不全ヌードマウスにおけるｙｂｂＲタグ付きトラスツズマブＡＤＣ抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１１２２）のインビボ有効性研究を示す。異種移植片腫瘍モデルを、ＨＥＲ２依存性乳癌細胞系ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６を皮下投与したｎｕ／ｎｕマウスで行った。腫瘍を約２００ｍｍ^{3}のサイズまで成長させた後に、ｙｂｂＲタグ付きＡＤＣ３ｍｇ／ｋｇ（▲）、５ｍｇ／ｋｇ（●）の単回用量、またはビヒクルのみ（■）を、１処置群あたり９匹のマウスに静脈内注射した。垂直の矢印は、ＡＤＣ投与時点を示している。腫瘍成長を毎週モニタリングすることで、両方の用量レベルが結果として腫瘍の退縮をもたらしたことが明らかとなり、このことによって、ペプチドタグ付きＡＤＣのインビボ有効性が実証された。

【発明を実施するための形態】

【０２１１】

本発明は、対象とする抗体の１つまたは複数の特定部位に組み込まれたペプチド配列（「ペプチドタグ」）の翻訳後修飾を触媒する４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質（「ＰＰＴアーゼ」）を使用して、抗体を部位特異的に標識する方法を提供する。周囲反応条件下での酵素標識によって、抗体に組み込まれたペプチドタグ内の特異的セリン残基の定量的および不可逆的共有結合修飾が可能となり、したがって、所望の抗体コンジュゲートが創製される。

【０２１２】

ＰＰＴアーゼに広い基質認容性があるので、本発明による部位特異的抗体標識は、抗癌薬、フルオロフォア、ペプチド、糖、洗浄薬、ポリエチレングリコール、免疫賦活薬、放射性イメージングプローブ、プロドラッグ、および他の分子などの様々な化学的にアクセス可能な標識試薬で達成することができる。さらに、ＰＰＴアーゼを使用して、ペプチドタグ付き抗体を、ポリスチレンナノ粒子および金表面などの固体支持体上に固定化することができる（例えば、機能性酵素を固定化する方法については、Wongら、Org. Biomol. Chem. 8: 782～787, 2010; Wongら、Nanoscale 4:659～666, 2012を参照されたい）。

【０２１３】

したがって、本発明は、癌療法において使用するための規定の薬物対抗体比を有する均一な免疫コンジュゲートを調製する方法、およびそれによって調製された免疫コンジュゲート、さらにはこれらの免疫コンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。本発明の方法は、当技術分野で公知の他のコンジュゲーション方法と組み合わせて使用することができる。

【０２１４】

１．抗体の操作

部位特異的標識

本発明による「構造的ループ」または「非ＣＤＲ－ループ」は、下記のように理解されたい：抗体は、免疫グロブリンフォールドを伴うドメインから作製されている。本質的に、逆平行βシートはループによって接続されて、圧縮された逆平行βバレルを形成している。可変領域では、ドメインのループのうちの一部が、抗体の特異性、すなわち、抗原へ

の結合に本質的に寄与する。これらのループは、「ＣＤＲ－ループ」と呼ばれる。抗体ドメインの他のループはすべて、分子構造および／またはエフェクター機能にむしろ寄与している。これらのループは本明細書では、「構造的ループ」または「非ＣＤＲ－ループ」と定義される。

【０２１５】

本発明の抗体（例えば、１個または複数の天然に存在しないアミノ酸を含有してもよい親抗体または天然抗体）は、Edelmanら、Proc. Natl. Acad. USA 63:78～85(1969)において示されているとおりのＥｕナンバリングシステムによってナンバリングされている。ヒトＩｇＧ１定常領域を、本出願を通じて代表として使用している。しかしながら、本発明はヒトＩｇＧ１に限定されることなく；対応するアミノ酸位置を、配列アラインメントによって容易に演繹することができる。例えば、図３（Ａ）は、ＩｇＧ１重鎖定常領域を示しており、この際、構造的ループは下線を付されており、これらの下線を付された構造的ループは、図４（Ａ）の配列アラインメントにおいて示されているとおりＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４について容易に同定することができる。図３（Ｂ）は、軽鎖定常領域を示しており、この際、構造的ループは下線を付されている。軽鎖定常領域では、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４は同一である。次の表１に、それぞれＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４の構造的ループにおけるアミノ酸位置を列挙する。

【０２１６】

【表１－１】

表1.同定された構造的ループの位置(IgG1はEuナンバリングによる)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
重鎖	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)
	131(S)132(S)133(K) 134(S)135(T)136(S) 137(G)138(G)139(T) (配列番号 1018)	131(C)132(S)133(R) 134(S)135(T)136(S) 137(E)138(S)139(T) (配列番号 1019)	131(C)132(S)133(R) 134(S)135(T)136(S) 137(G)138(G)139(T) (配列番号 1020)	131(C)132(S)133(R) 134(S)135(T)136(S) 137(E)138(S)139(T) (配列番号 1019)
	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)
	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (配列番号1021)	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (配列番号 1021)	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (配列番号 1021)	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (配列番号 1021)
	171(P)172(A)	171(P)172(A)	171(P)172(A)	171(P)172(A)
	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)
	189(P)190(S)191(S) 192(S)193(L)194(G) 195(T)196(Q)197(T) (配列番号 1022)	189(P)190(S)191(S) 192(N)193(F)194(G) 195(T)196(Q)197(T) (配列番号 1023)	189(P)190(S)191(S) 192(S)193(L)194(G) 195(T)196(Q)197(T) (配列番号 1022)	189(P)190(S)191(S) 192(S)193(L)194(G) 195(T)196(K)197(T) (配列番号 1024)
	205(K)206(P)207(S)	205(K)206(P)207(S)	205(K)206(P)207(S)	205(K)206(P)207(S)

【表１－２】

	208(N)(配列番号1025)	208(N)(配列番号1025)	208(N)(配列番号1025)	208(N)(配列番号1025)
	230(P)231(A)232(P)233(E)234(L)235(L)236(G)236(G)(配列番号1026)	227(P)228(A)229(P)230(P)231(V)232(A)233(G)(配列番号1027)	277(P)278(A)279(P)280(E)281(L)282(L)283(G)284(G)(配列番号1026)	227(P)228(A)229(P)230(E)231(F)232(L)233(G)234(G)(配列番号1028)
	244(P)245(P)246(K)	240(P)241(P)242(K)	291(P)292(P)293(K)	241(P)242(P)243(K)
	253(I)254(S)255(R)256(T)257(P)258(E)(配列番号1029)	249(I)250(S)251(R)252(T)253(P)254(E)(配列番号1029)	300(I)301(S)302(R)303(T)304(P)305(E)(配列番号1029)	250(I)251(S)252(R)253(T)254(P)255(E)(配列番号1029)
	267(S)268(H)269(E)270(D)271(P)272(E)(配列番号1030)	263(S)264(H)265(E)266(D)267(P)268(E)(配列番号1030)	314(S)315(H)316(E)317(D)318(P)319(E)(配列番号1030)	264(S)265(Q)266(E)267(D)268(P)269(E)(配列番号1031)
	280(D)281(G)	276(D)277(G)	327(D)328(G)	277(D)278(G)
	285(H)286(N)287(A)	281(H)282(N)283(A)	332(H)333(N)334(A)	282(H)283(N)284(A)
	291(P)292(R)	287(P)288(R)	338(P)339(R)	288(P)289(R)
	295(Q)296(Y)297(N)298(S)299(T)(配列番号1032)	291(Q)292(F)293(N)294(S)295(T)(配列番号1033)	342(Q)343(Y)344(N)345(S)346(T)(配列番号1032)	292(Q)293(F)294(N)295(S)296(T)(配列番号1033)
	307(T)308(V)309(L)310(H)311(Q)(配列番号1034)	303(T)304(V)305(V)306(H)307(Q)(配列番号1035)	354(T)355(V)356(L)357(H)358(Q)(配列番号1034)	304(T)305(V)306(L)307(H)308(Q)(配列番号1034)
	315(N)316(G)317(K)318(E)(配列番号1036)	311(N)312(G)313(K)314(E)(配列番号1036)	362(N)363(G)364(K)365(E)(配列番号1036)	312(N)313(G)314(K)315(E)(配列番号1036)
	326(K)327(A)328(L)329(P)330(A)331(P)(配列番号1037)	322(K)323(G)324(L)325(P)326(A)327(P)(配列番号1038)	373(K)374(A)375(L)376(P)377(A)378(P)(配列番号1037)	323(K)324(G)325(L)326(P)327(S)328(S)(配列番号1039)
	339(A)340(K)341(G)342(Q)343(P)344(R)345(E)(配列番号1040)	335(T)336(K)337(G)338(Q)339(P)340(R)341(E)(配列番号1041)	386(T)387(K)388(G)389(Q)390(P)391(R)392(E)(配列番号1041)	336(A)337(K)338(G)339(Q)340(P)341(R)342(E)(配列番号1040)
	355(R)356(D/E)357(E)358(L/M)359(T)360(K)361(N)(配列番号1042)	351(R)352(E)353(E)354(M)355(T)356(K)357(N)(配列番号1043)	402(R)403(E)404(E)405(M)406(T)407(K)408(N)(配列番号1043)	352(Q)353(E)354(E)355(M)356(T)357(K)358(N)(配列番号1044)
	384(N)385(G)	380(N)381(G)	431(S)432(G)	381(N)382(G)
	388(E)389(N)390(N)	384(E)385(N)386(N)	435(E)436(N)437(N)	385(E)386(N)387(N)
	394(T)395(P)396(P)	390(T)391(P)392(P)	441(T)442(P)443(P)	391(T)392(P)393(P)
	399(D)400(S)401(D)402(G)(配列番号1045)	395(D)396(S)397(D)398(G)(配列番号1045)	446(D)447(S)448(D)449(G)(配列番号1045)	396(D)397(S)398(D)399(G)(配列番号1045)
	415(S)416(R)417(W)418(Q)419(Q)420(G)421(N)422(V)(配列番号1046)	411(S)412(R)413(W)414(Q)415(Q)416(G)417(N)418(V)(配列番号1046)	462(S)463(R)464(W)465(Q)466(Q)467(G)468(N)469(I)(配列番号1047)	412(S)413(R)414(W)415(Q)416(E)417(G)418(N)419(V)(配列番号1048)
	433(H)434(N)435(H)	429(H)430(N)431(H)	480(H)481(N)482(R)	430(H)431(N)432(H)
	442(S)443(L)444(S)445(P)446(G)(配列番号1049)	438(S)439(L)440(S)441(P)442(G)(配列番号1049)	489(S)490(L)491(S)492(P)493(G)(配列番号1049)	439(S)440(L)441(S)442(L)443(G)(配列番号1050)
	109(T)110(V)111(A)	109(T)110(V)111(A)	109(T)110(V)111(A)	109(T)110(V)111(A)

【表１－３】

軽鎖	112(A)(配列番号1051)	112(A)(配列番号1051)	112(A)(配列番号1051)	112(A)(配列番号1051)
	119(P)120(P)121(S)122(D)123(E)(配列番号1052)	119(P)120(P)121(S)122(D)123(E)(配列番号1052)	119(P)120(P)121(S)122(D)123(E)(配列番号1052)	119(P)120(P)121(S)122(D)123(E)(配列番号1052)
	140(Y)141(P)142(R)143(E)144(A)(配列番号1053)	140(Y)141(P)142(R)143(E)144(A)(配列番号1053)	140(Y)141(P)142(R)143(E)144(A)(配列番号1053)	140(Y)141(P)142(R)143(E)144(A)(配列番号1053)
	151(D)152(N)153(A)154(L)155(Q)156(S)(配列番号1054)	151(D)152(N)153(A)154(L)155(Q)156(S)(配列番号1054)	151(D)152(N)153(A)154(L)155(Q)156(S)(配列番号1054)	151(D)152(N)153(A)154(L)155(Q)156(S)(配列番号1054)
	161(E)162(S)163(V)164(T)165(E)166(Q)167(D)168(S)(配列番号1055)	161(E)162(S)163(V)164(T)165(E)166(Q)167(D)168(S)(配列番号1055)	161(E)162(S)163(V)164(T)165(E)166(Q)167(D)168(S)(配列番号1055)	161(E)162(S)163(V)164(T)165(E)166(Q)167(D)168(S)(配列番号1055)
	197(T)198(H)199(Q)200(G)201(L)202(S)203(S)204(P)(配列番号1056)	197(T)198(H)199(Q)200(G)201(L)202(S)203(S)204(P)(配列番号1056)	197(T)198(H)199(Q)200(G)201(L)202(S)203(S)204(P)(配列番号1056)	197(T)198(H)199(Q)200(G)201(L)202(S)203(S)204(P)(配列番号1056)
	207(K)208(S)	207(K)208(S)	207(K)208(S)	207(K)208(S)

【０２１７】

図３、さらには配列番号２４および９３は、ＩｇκＩｇγ－１重鎖定常領域の配列をそれぞれ表している。配列番号２４および９３中のＸ’$_1$、Ｘ’$_2$、Ｘ’$_3$、Ｘ’$_4$、Ｘ’$_5$、およびＸ’$_6$は、ＩｇＧ１サブクラスおよびκアイソタイプ内のアロタイプ位置に存在する残基を示している（Jefferisら、MAbs. 1:332～338(2009)による）。Ｘ’$_1$は、ＡｒｇまたはＬｙｓであってよく、Ｘ’$_2$は、ＡｓｐまたはＧｌｕであってよく、Ｘ’$_3$は、ＬｅｕまたはＭｅｔであってよく、Ｘ’$_4$は、ＡｌａまたはＧｌｙであってよく、Ｘ’$_5$は、ＶａｌまたはＡｌａであってよく、Ｘ’$_6$は、ＬｅｕまたはＶａｌであってよい。

【０２１８】

ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４抗体定常領域の高い配列相同性により、本発明の所見は、いずれの特定の抗体にも限定されない。加えて、本発明の所見は、ＰＰＴアーゼの使用に限定されない。本明細書において同定する抗体構造的ループ内での位置はまた、酵素ビオチンタンパク質リガーゼ（ＢＰＬ）、トランスグルタミナーゼ、およびホルミルグリシン形成酵素などの他の酵素的コンジュゲーション手法のための基質である他のペプチドタグを組み込むために使用することができる。

【０２１９】

一態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体またはその断片は、それ自体が４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含み、前記ペプチドタグは、修飾抗体またはその断片の構造的ループ、またはＣ－もしくはＮ末端内に設置されている。本発明はまた、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含む修飾抗体またはその断片を提供し、この際、前記ペプチドタグは、抗体またはその断片の構造的ループ、またはＣ－もしくはＮ末端内に設置されている。具体的な実施形態では、前記ペプチドタグは、表２に記載されているものから選択される１個または複数のペプチドである。一態様では、ペプチドタグを、前記抗体またはその断片の構造的ループの２個のアミノ酸の間に挿入する。別の態様では、ペプチドタグを、前記抗体またはその断片の構造的ループ、Ｃ－、またはＮ末端にグラフトし、この際、ペプチドタグは、親抗体またはその断片の１個または複数のアミノ酸に置き換わる。一態様では、構造的ループは、前記抗体またはその断片のＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはＣ$_L$領域に設置されている構造的ループを指す。修飾抗体重鎖および／または軽鎖（またはその断片）は、１、２、３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上のタンパク質タグをその構造的ループ中に含有してよい。一態様では、修飾抗体または抗体断片は、２、４、６、８個、またはそれ以

上のタンパク質タグをその構造的ループ中に含有する。別の態様では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型である。一態様では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、ヒト（Homo sapiens）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、サーモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）、クロストリジウム・テルモセルム（Clostridium thermocellum）、さらには、任意の他の哺乳動物、細菌、または真菌ゲノムに由来する。別の態様では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、またはそれらの変異体に対する相同タンパク質である。一実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、好熱生物に由来する。一部の実施形態では、親抗体（ペプチドタグが組み込まれていない抗体）は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＡ抗体である。一部の実施形態では、親抗体はＩｇＧ１抗体である。一部の他の実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体である。

【０２２０】

「４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質」は、本明細書で使用する場合、記載されている構造が、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたは末端基が結合しているＣｏＡ類似体と接触させた場合に、本明細書のスキームＩａに図示されているとおり４’－ホスホパンテテイン（ｐｐａｎ）または修飾ｐｐａｎ基のためのアクセプターとして役立ち得ることを意味する。

【０２２１】

一態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体またはその断片は、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、および／またはC_L領域を含み、前記ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、および／またはC_L領域はさらに、それ自体が４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含む。本発明はまた、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、および／またはC_L領域を含む修飾抗体またはその断片を提供し、この際、前記ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、および／またはC_L領域は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグをさらに含む。一部の実施形態では、前記ペプチドタグは、表２に記載されているものから選択される１個または複数のペプチドである。一部の実施形態では、ペプチドタグを、前記抗体またはその断片の構造的ループの２個のアミノ酸の間に挿入する。一部の実施形態では、ペプチドタグを、前記抗体またはその断片の構造的ループにグラフトする。修飾抗体重鎖および／または軽鎖（またはその断片）は、その構造的ループ中に１、２、３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有してよい。一部の実施形態では、修飾抗体または断片は、その構造的ループ中に２、４、６、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有する。一部の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型である。一部の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、ヒト（Homo sapiens）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、サーモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）、クロストリジウム・テルモセルム（Clostridium thermocellum）、さらには、任意の他の哺乳動物、細菌、または真菌ゲノムに由来する。一部の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、またはそれらの変異体に対する相同タンパク質である。一実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、好熱生物に由来する。一部の実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＡ抗体である。具体的な実施形態では、親抗体はＩｇＧ１抗体である。一部の実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体である。

【０２２２】
本明細書で使用する場合、活性を「保持している」とは、記載されている酵素が、枯草菌（B. subtilis）Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼである基準物質に対して少なくとも約１０％の活性を維持していることを意味する（例えば、Quadriら、Biochemistry 37: 1585～1595(1998)を参照されたい）。例えば、異なる４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼまたはその酵素の変異体型は、同一反応条件下で、すなわち、同じＣｏＡ基質、同じペプチドタグ付き抗体、同一の緩衝液条件、同一の基質および酵素濃度、同じ温度、ならびに同じ反応期間を使用して、Ｓｆｐと比較して、少なくとも約１０％の４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持している。
【０２２３】
一態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体またはその断片は、それ自体が４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含み、前記ペプチドタグは、親抗体またはその断片のV_Hドメインの２位および３位の間、V_Hドメインの６３位および６４位の間、V_Hドメインの６４位および６５位の間、ＣＨ１ドメインの１３８位および１３９位の間、ＣＨ１ドメインの１９７位および１９８位の間、ＣＨ３ドメインの３５９位および３６０位の間、ＣＨ３ドメインの３８８位および３８９位の間、ＣＨ３ドメインのＣ末端（Ｌｙｓ４４７の後）、および／またはV_Lドメインの２位および３位の間に挿入されている。別の態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体またはその断片は、それ自体が４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含み、ペプチドタグは、親抗体またはその断片のＶＨもしくはＶＬドメインのアミノ酸残基２および３の間、または軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間、またはＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６４および１６５の間、もしくは１６５および１６６の間、もしくは１９４および１９５の間、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間、もしくは４４５および４４６の間、もしくは４４６および４４７の間に挿入されている。一部の実施形態では、ペプチドタグは、親抗体またはその断片の軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間、またはＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６５および１６６の間、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間に挿入されている。
【０２２４】
一態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体またはその断片は、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、および／または配列番号１４１を含む。別の態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体または抗体断片は、配列番号２６、配列番号２７、配列番号３２、配列番号６３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３９、配列番号１４９、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号２４８、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５６、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８４、配列番号３８６、配列番号３８７、または配列番号３８８を含む。一部の実施形態では、修飾抗体または抗体断片は、配列番号３２、配列番号６３、配列番号１２７、配列

番号１２９、配列番号１３２、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６８、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７４、または配列番号３８４を含む。

【０２２５】

本明細書に記載の免疫コンジュゲートに関して、一態様では、前記ペプチドタグは、表２に記載されているものから選択される１個または複数のペプチドである。修飾抗体重鎖および／または軽鎖（またはその断片）は、その構造的ループ中に１、２、３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有してよい。一実施形態では、修飾抗体または抗体断片は、その構造的ループ中に２、４、６、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有する。別の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型である。一実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、ヒト（Homo sapiens）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、サーモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）、クロストリジウム・テルモセルム（Clostridium thermocellum）、さらには、任意の他の哺乳動物、細菌、または真菌ゲノムに由来する。具体的な実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼはＳｆｐであり、ペプチドタグは、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、およびＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）から選択される。一実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＡ抗体である。具体的な実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ１抗体である。別の具体的な実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体である。

【０２２６】

別の態様では、本発明は、修飾抗体またはその断片と末端基とを含む免疫コンジュゲートを提供し、この際、前記修飾抗体またはその断片は、それ自体が４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含み、前記ペプチドタグは、抗体またはその断片の構造的ループ、またはＣ－もしくはＮ末端にグラフトされている。具体的な実施形態では、前記ペプチドタグは、親抗体またはその断片のV_Hドメインのアミノ酸位置６２～６４（アミノ酸６２および６３での変異、ならびにアミノ酸６３および６４の間への残りのペプチドタグの挿入）に、V_Hドメインのアミノ酸位置６２から６５（アミノ酸６２～６４での変異、ならびにアミノ酸６４および６５の間への残りのペプチドタグの挿入）に；ＣＨ１ドメインのアミノ酸位置１３３～１３９（アミノ酸１３３～１３８の変異、ならびにアミノ酸１３８～１３９間への残りのペプチドタグの挿入）に、ＣＨ１ドメインのアミノ酸位置１８９～１９５に、および／またはＣＨ１ドメインのアミノ酸位置１９０～１９８（アミノ酸１９０～１９７の変異、ならびに１９７および１９８の間への残りのペプチドタグの挿入）にグラフトされている。一実施形態では、前記ペプチドタグは、表２に記載されているものから選択される１個または複数のペプチドである。修飾抗体重鎖および／または軽鎖（またはその断片）は、その構造的ループ中に１、２、３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有してよい。一実施形態では、修飾抗体または抗体断片は、その構造的ループ中に２、４、６、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有する。別の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型である。一実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、ヒト（Homo sapiens）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、サーモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）、クロストリジウム

・テルモセルム（Clostridium thermocellum）、さらには、任意の他の哺乳動物、細菌、または真菌ゲノムに由来する。具体的な実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼはＳｆｐであり、ペプチドタグは、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、およびＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）から選択される。一実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＡ抗体である。具体的な実施形態では、親抗体はＩｇＧ１抗体である。別の具体的な実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体である。

【０２２７】

別の態様では、本発明は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含む修飾抗体またはその断片を提供し、この際、前記ペプチドタグは、親抗体またはその断片のV_Hドメインの２位および３位の間、V_Hドメインの６３位および６４位の間、V_Hドメインの６４位および６５位の間、ＣＨ１ドメインの１３８位および１３９位の間、ＣＨ１ドメインの１９７位および１９８位の間、ＣＨ３ドメインの３５９位および３６０位の間、ＣＨ３ドメインの３８８位および３８９位の間、ＣＨ３ドメインのＣ末端（Ｌｙｓ４４７の後）、および／またはV_Lドメインの２位および３位の間に挿入されている。別の態様では、ペプチドタグは、親抗体またはその断片のＶＨもしくはＶＬドメインのアミノ酸残基２および３の間、または軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間、またはＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６４および１６５の間、もしくは１６５および１６６の間、もしくは１９４および１９５の間、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間、もしくは４４５および４４６の間、もしくは４４６および４４７の間に挿入されている。一部の実施形態では、ペプチドタグは、親抗体またはその断片の軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間、またはＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６５および１６６の間、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間に挿入されている。

【０２２８】

別の態様では、本発明は、配列番号１０３、配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１２１、配列番号１２２、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、および／または配列番号１４１を含む修飾抗体またはその断片を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号２６、配列番号２７、配列番号３２、配列番号６３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３９、配列番号１４９、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号２４８、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５６、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８４、配列番号３８６、配列番号３８７、または配列番号３８８を含む修飾抗体またはその断片を提供する。一部の実施形態では、本発明は、配列番号３２、配列番号６３、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３２、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６８、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７４、または配列番号３８４を含む修飾抗体またはその断片を提供する。

【０２２９】

一態様では、前記ペプチドタグは、表２に記載されているものから選択される１個または複数のペプチドである。抗体重鎖および／または軽鎖（またはその断片）は、その構造的ループ中に１、２、３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有してよい。一部の実施形態では、抗体または断片は、その構造的ループ中に２、４、６、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有する。一部の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型である。一部の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、ヒト（Homo sapiens）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、サーモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）、クロストリジウム・テルモセルム（Clostridium thermocellum）、さらには、任意の他の哺乳動物、細菌、または真菌ゲノムに由来する。具体的な実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐであり、ペプチドタグは、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、およびＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）から選択される。一部の実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＡ抗体である。具体的な実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ１抗体である。一部の実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体である。

【０２３０】

別の態様では、本発明は、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であるペプチドタグを含む修飾抗体またはその断片を提供し、この際、前記ペプチドタグは、抗体またはその断片の構造的ループ、またはＣ－もしくはＮ末端にグラフトされている。一部の実施形態では、前記ペプチドタグは、親抗体またはその断片のV_Hドメインのアミノ酸位置６２～６４（アミノ酸６２および６３での変異、ならびにアミノ酸６３および６４の間への残りのペプチドタグの挿入）に、V_Hドメインのアミノ酸位置６２から６５（アミノ酸６２～６４での変異、ならびにアミノ酸６４および６５の間への残りのペプチドタグの挿入）に；ＣＨ１ドメインのアミノ酸位置１３３～１３９（アミノ酸１３３～１３８の変異、ならびにアミノ酸１３８～１３９間へのペプチドタグの挿入）に、ＣＨ１ドメインのアミノ酸位置１８９～１９５に、および／またはＣＨ１ドメインのアミノ酸位置１９０～１９８（アミノ酸１９０～１９７の変異、ならびに１９７および１９８の間への残りのペプチドタグの挿入）にグラフトされている。一実施形態では、前記ペプチドタグは、表２に記載されているものから選択される１個または複数のペプチドである。修飾抗体重鎖および／または軽鎖（またはその断片）は、その構造的ループ中に１、２、３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有してよい。一実施形態では、修飾抗体または抗体断片は、その構造的ループ中に２、４、６、８個、またはそれ以上のタンパク質タグを含有する。別の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体型である。一実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、ヒト（Homo sapiens）、枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（Escherichia coli）、サーモトガ・マリティマ（Thermotoga maritima）、クロストリジウム・テルモセルム（Clostridium thermocellum）、さらには、任意の他の哺乳動物、細菌、または真菌ゲノムに由来する。一部の実施形態では、前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼはＳｆｐであり、ペプチドタグは、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、およびＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）から選択される。一実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＡ抗体である。具体的な実施形態では、親抗体はＩｇＧ１抗体である。一部の実施形態では、親抗体は、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体

である。

【０２３１】

ある特定の態様では、本明細書で提供する修飾抗体は、１つまたは複数の直交性コンジュゲーション部位を含有するように操作されている。そのような直交性コンジュゲーション部位は、これらだけに限定されないが、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質、ＡｃｐＳ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、ヒト４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、非天然アミノ酸、ピロリシンおよびピロリン－カルボキシ－リシンを含む。直交性コンジュゲーション部位はまた、酵素的に、または化学的に修飾され得るペプチド配列、例えば、テトラシステインタグ、ＬＰＸＴＧ－ソルターゼペプチド（配列番号１０５７）（Ｘは任意のアミノ酸である）、ビオチンアクセプターペプチド、ＣＸＰＸＲ－アルデヒドタグ（配列番号１０５８）（Ｘは任意のアミノ酸である）、またはＨｉｓタグであってよい。ある特定の実施形態では、本発明の方法を、これらだけに限定されないが、システイン、リシン、ヒスチジン、チロシン、ホルミル－グリシン、ピロリシン、ピロリン－カルボキシリシン、および非天然アミノ酸を介しての化学選択的コンジュゲーションを含めた当技術分野で公知の他のコンジュゲーション方法と組み合わせて使用して、そのような操作された抗体を標識する。

【０２３２】

ある特定の態様では、酵素ＳｆｐおよびＡｃｐＳを、抗体のＶＨ、ＶＬ、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはC_L領域に設置されたＳシリーズのペプチド（例えば、Ｓ１、Ｓ２、Ｓ３、Ｓ４、Ｓ５、Ｓ６およびＳ７）およびＡシリーズのペプチド（例えば、Ａ１、Ａ－１、Ａ－２、Ａ－３、Ａ－４およびＡ－６）（表２も参照されたい）を含有するように操作された抗体上に、同じか、または２種の異なる標識を直交的部位特異的に標識するために使用する。

【０２３３】

他の態様では、酵素ＳｆｐおよびＡｃｐＳを、抗体のＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはC_L領域に設置されたｙｂｂＲシリーズのペプチド（例えば、ｙｂｂＲ１１、ｙｂｂＲ１２、およびｙｂｂＲ１３）およびＡシリーズのペプチド（例えば、Ａ１、Ａ－１、Ａ－２、Ａ－３、Ａ－４およびＡ－６）を含有するように操作された抗体上に、２種の異なる標識を直交的部位特異的に標識するために使用する。

【０２３４】

他の態様では、酵素ＳｆｐまたはＡｃｐＳを、抗体のＶＨ、ＶＬ、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはC_L領域に設置されたｙｂｂＲシリーズのペプチド（例えば、ｙｂｂＲ１１、ｙｂｂＲ１２、およびｙｂｂＲ１３）およびＡシリーズのペプチド（例えば、Ａ１、Ａ－１、Ａ－２、Ａ－３、Ａ－４、およびＡ－６）を含有するように操作された抗体上での直交性部位特異的標識のために、他のコンジュゲーション方法と組み合わせて使用する。そのような方法には、これらだけに限定されないが、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、ホルミルグリシン、非天然アミノ酸、ピロリシン、および／またはピロリン－カルボキシ－リシンとのコンジュゲーションが含まれる。そのような方法を使用して、ＳｆｐまたはＡｃｐＳを介しての酵素的コンジュゲーションのために使用される以外の同じか、または異なる標識を結合させることができる。

【０２３５】

４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質およびペプチド基質

本明細書で使用する場合、用語「４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ」（ＰＰＴアーゼ）および「４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質」は互換的に使用され、ｐｐａｎ基を、補酵素Ａ（ＣｏＡ）またはその類似体などのドナー分子から、ペプチドタグまたはアシルキャリヤータンパク質などの基質に輸送することが可能なあらゆるタンパク質またはその断片を指す。

【０２３６】
ＰＰＴアーゼは、脂肪酸シンターゼ（ＦＡＳ）、ポリケチドシンターゼ（ＰＫＳ）、および非リボソームペプチドシンテターゼ（ＮＲＰＳ）に関連したキャリヤータンパク質の翻訳後修飾を触媒する酵素である。これらのキャリヤータンパク質は一般に、ＡＣＰ、アシルキャリヤータンパク質（ＦＡＳおよびＰＫＳ）と、またはＰＣＰ、ペプチジルキャリヤータンパク質（ＮＲＰＳ）と称される。ＡＣＰおよびＰＣＰは、約８０アミノ酸からなり、通常、ドメインとして、ＦＡＳ、ＰＫＳ、またはＮＲＰＳ多酵素複合体中にまとまっている。一部の場合には、ＡＣＰおよびＰＣＰは、自立した自律的に折り畳まれたタンパク質としても見出される。ＡＣＰは、対応する代謝中間体を、共有結合を介して、その柔軟なｐｐａｎ補欠分子族に運ぶので、脂肪酸およびポリケチド生合成に必須である。ＰＣＰは、非リボソームペプチド合成において、ペプチド中間体をＮＲＰＳ多酵素複合体中の活性部位間で輸送することによって、類似の機能を実行する。ＰＰＴアーゼは、配列および構造的類似性および基質特異性に基づいて、３つの群に分類されている。ＰＰＴアーゼの第１群のメンバー、例えば、大腸菌（Escherichia coli）のＡｃｐＳは、約１２０アミノ酸残基長であり、ホモ三量体として機能し、例えば、ＩＩ型ＦＡＳおよびＰＫＳ系のアシルキャリヤータンパク質（ＡＣＰ）に限定されるかなり狭い基質特異性を有する。枯草菌（Bacillus subtilis）のＳｆｐまたはヒトＰＰＴアーゼによって例示される第２群のメンバーは、モノマーとして機能し、ＮＲＰ、ＦＡＳ、およびＰＫＳに関係するキャリヤータンパク質を含む幅広い基質特異性を有することが報告されている（例えば、Suoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA3 98:99～104、2001; Quadriら、Biochem.、37:1585～95、1998; Liuら、Arch. Microbiol、183:37～44、2005; Joshiら、J. Biol. Chem.、278:33142～33149、2003を参照されたい）。第３群は、酵母サイトゾルＦＡＳに関連するものなどのＩ型ＦＡＳに共有結合するＰＰＴアーゼを含む（例えば、Fichtlschererら、Eur. J. Biochem.、267:2666～71、2000を参照されたい）。

【０２３７】
本発明によれば、ＰＰＴアーゼには、これらだけに限定されないが、大腸菌（E. coli）からのＡｃｐＳ（Ｉ型ＰＰＴアーゼ）および枯草菌（B. subtilis）からのＳｆｐ（ＩＩ型ＰＰＴアーゼ）、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）、Ｓ．ポンベ（S. pombe）、Ｃ．アルバカンス（C. albacans）、Ｅ．ニデュランス（E. nidulans）、およびＰ．パツルム（P. patulum）からの脂肪酸シンターゼ（ＦＡＳ）に関連した統合ＰＰＴアーゼドメイン（ＩＩＩ型ＰＰＴアーゼ）、大腸菌（E. coli）、フレキシネル菌（S.flexneri）、ネズミチフス菌（S. typhimurium）、およびサルモネラ．オースチン（S. austin）からのＥｎｔＤ、Ｂ．プミルス（B. pumilus）からのＰｓｆ－１、Ｂ．ブレビス（B. brevis）からのＧｓｐ、アナベナ属（Anabaena sp.）からのＨｅｔｌ、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）からのＬｙｓ５、枯草菌（B. subtilis）からのＬｐａ－１４、ならびに大腸菌（E. coli）からの０１９５、Ｔ．マリティマ（T.maritima）ＭＳＢ８のＰＰＴアーゼ（ＮＰ＿２２８５０１）、ヒト（Homo sapiens）のＰＰＴアーゼ（ＮＰ＿０５６２３８）、ならびにそれらの相同体および変異体を含めた、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する天然に存在するタンパク質が含まれる。本発明のＰＰＴアーゼにはまた、上記のもの以外の種からの４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質、さらには、本明細書に記載のペプチド部分を４’－ホスホパンテテイニル化することが可能な人工的に、または組換えによって生成されたタンパク質が含まれる。

【０２３８】
ＳｆｐおよびＡｃｐＳは、キャリヤータンパク質ドメインについてのそれらの基質特異性と、それらの構造との両方に相違を示す２つのクラスの４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを表す（Flugalら、J. Biol. Chem.、275:959～968、2000;Lambalotら、Chem. Biol.、3:923～936、1996）。偽二量体（pseudodimeric）ＰＰＴアーゼのＳｆｐクラスは、サイズが約２３０残基であり、Ｓｆｐの結晶構造は、これが、同様のフォールドを取り入れている分子のＮ末端およびＣ末端の半分と、界面にある酵素の活性部位との

二重の対称性を有することを示唆している（Hodnelandら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99:5048～5052、2002;Koglinら、Science、312:273～276、2006）。対照的に、ＡｃｐＳは、約１２０残基長で、Ｓｆｐのサイズのほぼ半分であり、ＡｃｐＳの結晶構造は、この酵素が集合して三量体になっていて、ＡＣＰおよびＣｏＡ結合部位は、各モノマー間の界面で形成されることを示している（Reuterら、Embo. J.、18:6823～6831、1999;Chirgadzeら、Embo. J.、19:5281～5287、2000）。Ｓｆｐは、非リボソームペプチドシンテターゼ、ポリケチドシンターゼ、および脂肪酸シンターゼからのＰＣＰおよびＡＣＰドメインの両方を修飾し得るが、ＡｃｐＳは、ＡＣＰのみを修飾するという点で、Ｓｆｐは、ＡｃｐＳよりもかなり幅広い基質特異性を示すことが報告されている（Flugelら、J. Biol. Chem.、275:959～968、2000; Parrisら、Structure、8:883～895、2000; Mofidら、J. Biol. Chem.、277:17023～17031、2002）。

【０２３９】

ＰＰＴアーゼの両方の種類のＡＣＰおよびＰＣＰ基質は、セリン残基を有する４ヘリックスバンドルタンパク質と同様のフォールドを取り入れて、ＳｆｐおよびＡｃｐＳとの相互作用について重要な役割を果たすことが示されている第２αヘリックスの頂部にあるｐｐａｎ補欠分子族によって修飾される（Hodnelandら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99:5048～5052、2002;Chirgadzeら、Embo. J.、19:5281～5287、2000;Quadriら、Biochem.、37:1585～1595、1998;Liら、Biochem.、42:4648～4657、2003）。ＰＣＰおよびＡＣＰの間に明白なコンセンサス配列の相違は存在しないが、これら２種の間の最も有意な相違は、キャリヤータンパク質の静電表面電位であり、ＦＡＳおよびＰＫＳ系において、ＰＣＰでは中性タンパク質表面であり、ＡＣＰドメインでは負に荷電している酸性表面である（Parrisら、Structure、8:883～895、2000）。

【０２４０】

短いペプチド群が、ＰＰＴアーゼのための有効な基質として同定されている。例えば、ｙｂｂＲ１３は、１１アミノ酸残基ペプチドであり、Ｓｆｐの基質である（J. Yinら、Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ、102:15815～15820、2005;Z. Zhouら、ACS Chem Biol.、2:337～346、2007;Z. Zhouら、J. Am. Chem. Soc.、130: 9925～9930、2008）。ｙｂｂＲ１３ペプチド（ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９））は、枯草菌（B. subtilis）ゲノムのファージ提示型ライブラリから単離された（J. Yinら、Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ、102:15815～15820、2005）。ｙｂｂＲ１３ペプチドの配列の一部は、ｙｂｂＲと呼ばれる枯草菌（B. subtilis）オープンリーディングフレームに由来し、これは、ＡＣＰ、ＰＣＰ、およびアリールキャリヤータンパク質（ＡｒＣＰ）などのＰＰＴアーゼの既知の基質に保存されている（Ｈ／Ｄ）Ｓ（Ｌ／Ｉ）トリーペプチド配列をＮ末端に含む。ｙｂｂＲペプチドは、ＰＣＰにおいて保存されていることが見出されているアミノ酸配列、ＤｘＦＦｘｘＬＧＧ（配列番号１０５９）をそのＮ末端に含まない。部位特異的標識のための４’－ホスホパンテテイニル化反応において基質として使用することができるｙｂｂＲ１３ペプチドの修飾およびバリアントは記載されている（J. Yinら、Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ、102:15815～15820、2005）。ＰＰＴアーゼのための追加のペプチド基質は、それぞれＳｆｐまたはＡｃｐＳとのそれらの反応性に基づき「Ｓ」または「Ａ」と称されるＳシリーズのペプチドおよびＡシリーズのペプチドである（Z. Zhouら、ACS Chem Biol.、2:337～346、2007およびZ. Zhouら、J. Am. Chem. Soc.、130:9925～9930、2008）。例示的なＳシリーズのペプチドには、これらだけに限定されないが、Ｓｆｐのための有効な基質であるＳ６が含まれ、例示的なＡシリーズのペプチドには、これらだけに限定されないが、ＡｃｐＳのための有効な基質であるＡ１が含まれる。Ｓ６およびＡ１ペプチドは両方とも、１２アミノ酸残基長である。

【０２４１】

ペプチド基質の例を、下記の表２に列挙する。本発明によれば、これらの短いペプチドタグは、ＰＰＴアーゼによって触媒される反応において標的タンパク質（抗体を含む）を部位特異的に標識するために使用することができる。加えて、本明細書に記載のペプチドタグおよび個々のＰＰＴアーゼのペアリング、例えば、ｙｂｂＲ１３／ＳｆｐまたはＳ６

／ＳｆｐおよびＡ１／ＡｃｐＳは、例えば、細胞溶解産物中、または生細胞の表面上の１種（または複数の）標的タンパク質を直交的部位特異的に標識するために使用することもできる。

【０２４２】

【表２】

表2. PPTアーゼペプチド基質の例。修飾されたセリン残基に下線が付されている。

配列	配列番号	名称
GDSLSWLLRLLN	1	S6
GDSLSWL	2	S6切断
GDSLSWLVRCLN	3	S1
GDSLSWLLRCLN	4	S2
GDSLSWLVRLLN	5	S3
GDSLSWLLRSLN	6	S7
GSQDVLDSLEFIASKLA	7	Ybbr11
VLDSLEFIASKLA	8	Ybbr12
DSLEFIASKLA	9	Ybbr13
GDSLDMLEWSLM	10	A1
GDSLDMLEWSL	11	A-1
GDSLDMLEWS	12	A-2
GDSLDMLEW	13	A-3
DSLDMLEW	14	A-4
GDSLDM	15	A-6
LDSVRMMALAAR	16	E0
LDSLDMLEWSLR	17	E2
DSLEFIASKL	18	ybbR切断1
DSLEFIASK	19	ybbR切断2
DVLDSLEFI	20	ybbR8
VLDSLEFIAS	21	ybbR14
DSLDMLEWSL	1132	A1切断

【０２４３】

したがって、本発明は、表２に列挙されているペプチドタグのうちの１個または複数を含有する操作された抗体、およびそのような抗体を標識する方法、例えば、細胞毒とコンジュゲートする方法を提供する。標識化学を、下記および実施例において例示する。

【０２４４】

２．標識化学

本明細書において提供する修飾抗体またはその断片は、これらだけに限定されないが、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、ヒトＰＰＴアーゼまたはＴ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼを含むＰＰＴアーゼまたはその変異体を使用して、短いペプチドタグ（挿入もしくはグラフトされているか、またはそれらの組合せ）を翻訳後修飾することによって、部位特異的に標識される。そのような翻訳後修飾は、短いペプチドタグ中の保存セリン残基と補酵素Ａ（ＣｏＡ）または補酵素Ａ類似体の４’－ホスホパンテテイニル（ｐｐａｎ）基との間でのＰＰＴアーゼ触媒反応を伴う。この反応では、ＣｏＡのｐｐａｎ補欠分子族またはＣｏＡ類似体の修飾ｐｐａｎ補欠分子族が、抗体に組み込まれている（すなわち、挿入もしくはグラフトされているか、またはそれらの組合せ）短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基とホスホジエステル結合を形成することによって、短いペプチドタグに結合される。ｐｐａｎまたは修飾ｐｐａｎは、末端基（ＴＧ）に連結しており、ホスホジエステル結合の形成は、それによって、末端基（ＴＧ）を修飾抗体またはその断片と、ｐ

ｐａｎまたは修飾ｐｐａｎ部分を含むリンカーを介してコンジュゲートする。

【０２４５】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、１ステップ法によって標識し、この際、下記のスキーム（Ｉａ）～（Ｉｃ）に示すとおり、その翻訳後修飾は、末端基（ＴＧ）に連結しているＣｏＡまたは末端基（ＴＧ）に連結しているＣｏＡ類似体を、抗体の中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリンと反応させることによって起こる。別法では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片の翻訳後修飾の他の実施形態では、修飾抗体またはその断片を２ステップ法によって標識し、この際、その翻訳後修飾は、初めに、活性化ＣｏＡまたは活性化ＣｏＡ類似体を、抗体の中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリンと反応させ、続いて、官能化された末端基（ＴＧ）を、活性化ＣｏＡ上の反応性基または活性化ＣｏＡと反応させることを伴う。そのような２ステップ法は、下記のスキーム（ＩＩａ）～（ＩＩｆ）において図示する。本明細書において提供する修飾抗体またはその断片の翻訳後修飾の他の実施形態では、修飾抗体またはその断片を３ステップ法によって標識し、この際、その翻訳後修飾は、初めに、保護ｐｐａｎ補欠分子族を有するＣｏＡまたは保護ｐｐａｎ補欠分子族を有するＣｏＡ類似体を、抗体の中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリンと反応させ、それによって、ＣｏＡまたはＣｏＡ類似体を抗体と結合させることを伴う。第２のステップでは、保護ｐｐａｎ補欠分子族を脱保護し、それによって、反応性官能基を保護ｐｐａｎ補欠分子族上で生成させる。第３のステップでは、この反応性官能基を、末端基（ＴＧ）に連結させ、それによって、末端基を修飾抗体またはその断片に結合させる。そのような３ステップ法は、以下のスキーム（ＩＩＩａ）～（ＩＩＩｆ）において図示する。

【０２４６】

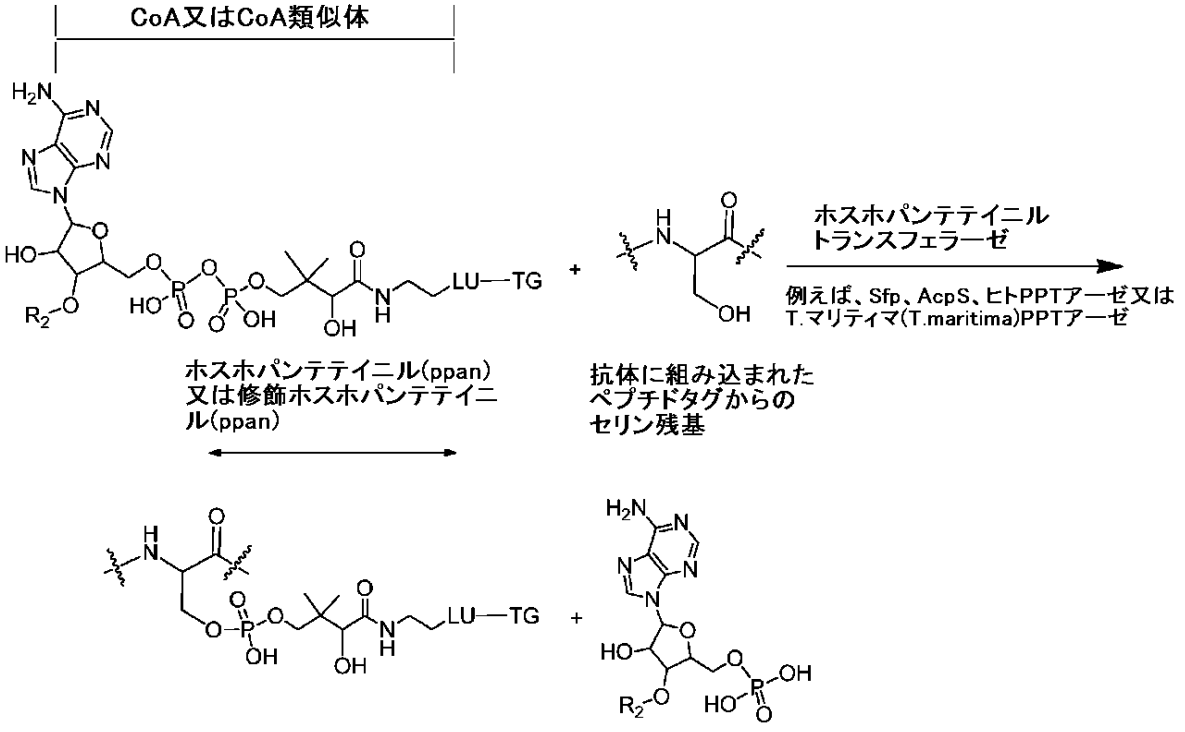
１ステップ法

本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を標識するために使用する１ステップ法をスキーム（Ｉａ）において示す：

【０２４７】

【化９０】

スキーム(Ia)



［式中、

Ｒ$_2$は、Ｈまたは－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）$_2$であり、

リンカーユニット（ＬＵ）は、末端基（ＴＧ）をＣｏＡ類似体の修飾ｐｐａｎ補欠分子族に連結する化学部分であり、

末端基（ＴＧ）は、抗癌薬、抗炎症薬、抗真菌薬、抗菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、および麻酔薬から選択される薬物部分、生物物理学的プローブ、フルオロフォア、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、スピン標識、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、ペプチド、抗体、抗体断片、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、または表面である。

【０２４８】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、またはそれらの任意の組合せから選択されるリンカーを含み、リンカーユニット（ＬＵ）は、自壊的（self-immolative）スペーサーを含有してもよい。

【０２４９】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、$-L_1-L_2-L_3-L_4-$であり、この際、

L_1は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_2は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_3は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_4は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーである。

【０２５０】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、$-L_1-L_2-L_3-L_4-$であり、この際、

L_1は、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_2は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_3は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

L_4は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーである。

【０２５１】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、$-L_1-L_2-L_3-L_4-$であり、この際、

L_1は、結合、$-A_1-$、$-A_1X^2-$、または$-X^2-$であり、この際、

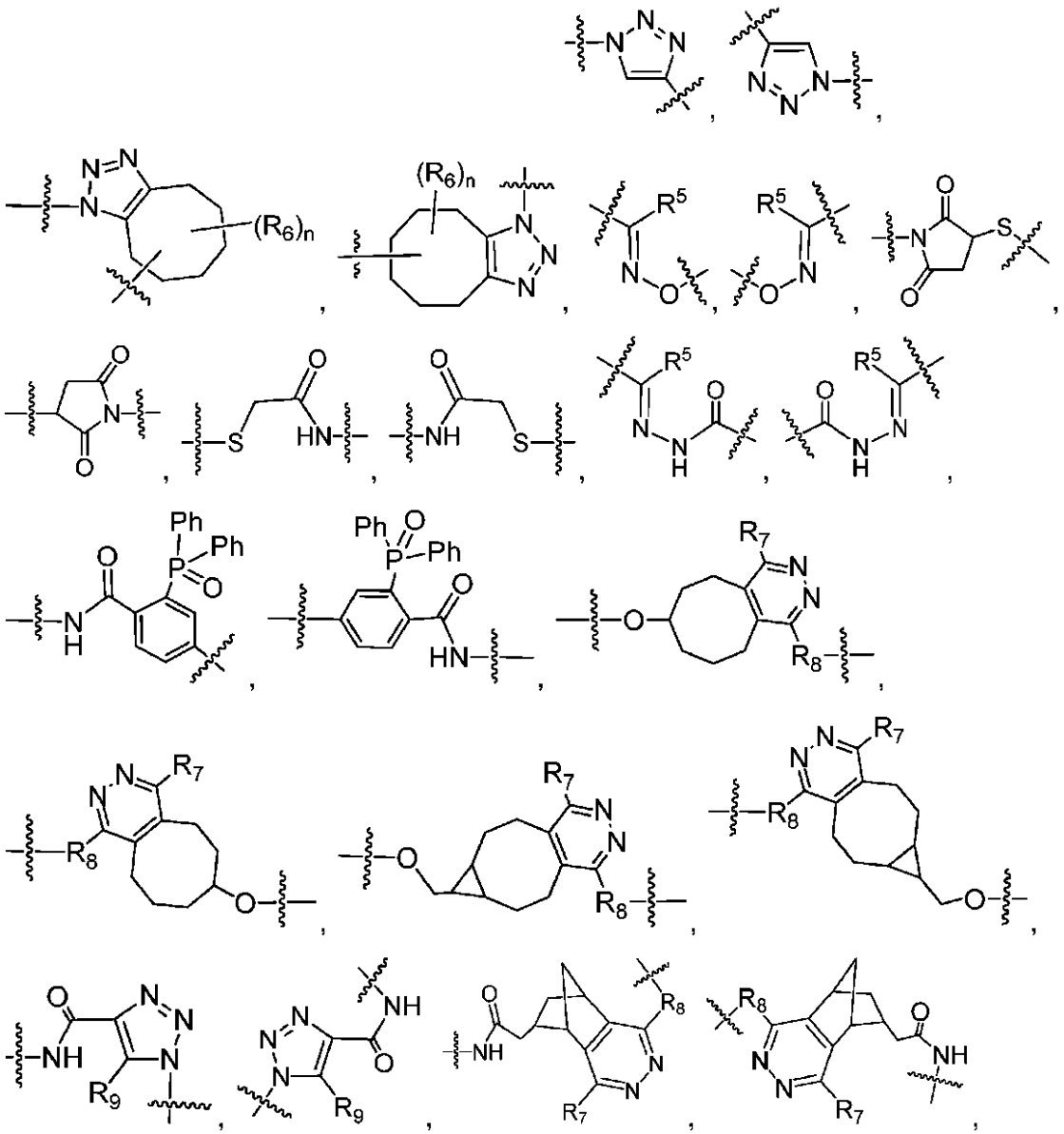
A_1は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$

、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－であり、

各Ｘ^{2}は、独立に、結合、

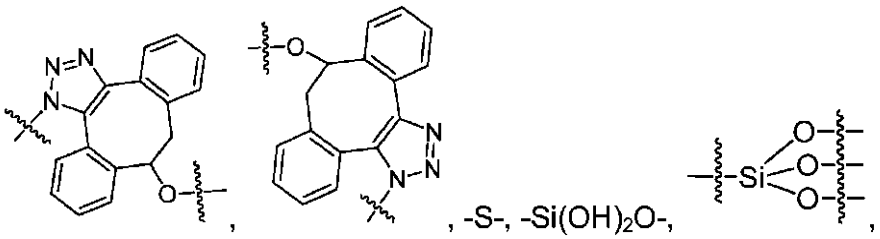
【０２５２】

【化９１】



【０２５３】

【化９２】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

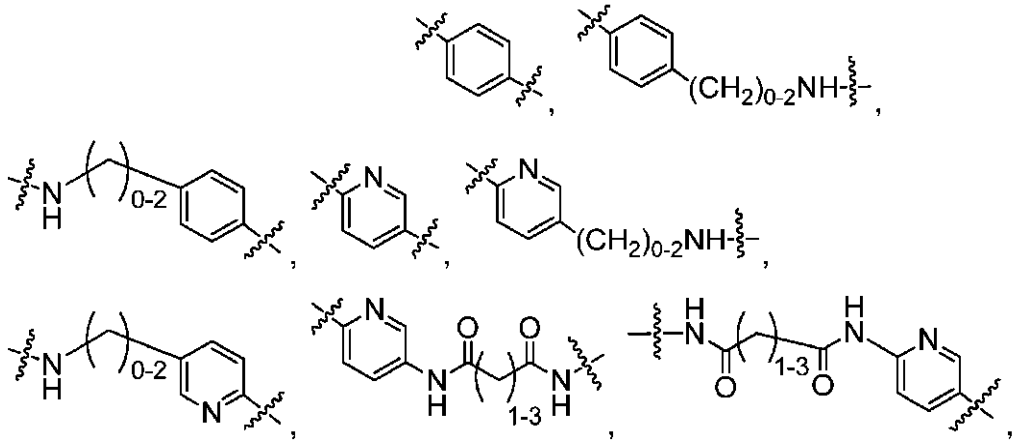
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【０２５４】

【化９３】



から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1～6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８および９から選択され、

Ｌ$_{2}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

Ｌ$_{3}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

Ｌ$_{4}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーである］。

【０２５５】

ある特定の実施形態では、Ｌ$_{1}$は、Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$－Ｓ－であり、したがって、ＬＵは、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$－Ｓ－Ｌ$_{2}$－Ｌ$_{3}$－Ｌ$_{4}$－である。

【０２５６】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、－Ｌ$_1$－Ｌ$_2$－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－であり、この際、

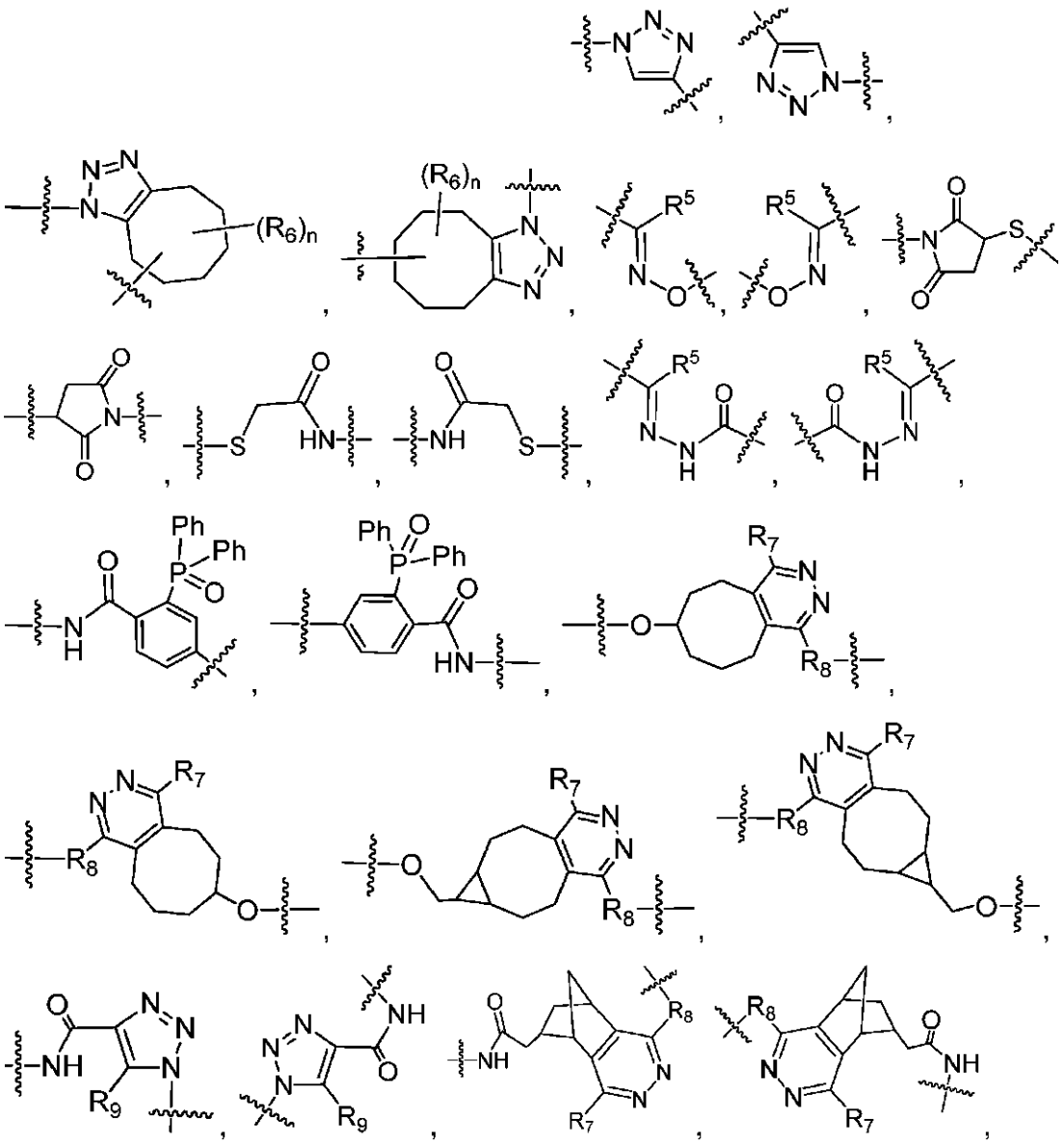
Ｌ$_1$は、結合、－Ａ$_1$－、－Ａ$_1$Ｘ^2－、または－Ｘ^2－であり、この際、

Ａ$_1$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、または－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、

各Ｘ^{2}は、独立に、結合、

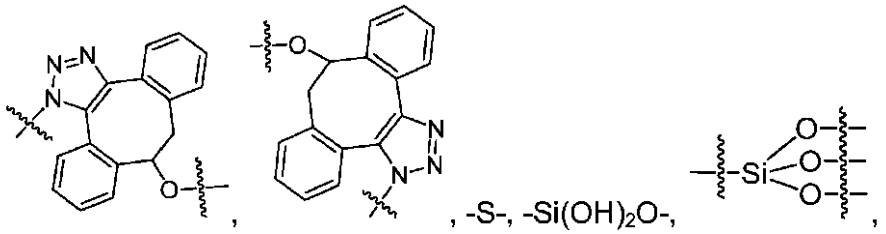
【０２５７】

【化９４】



【０２５８】

【化９５】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

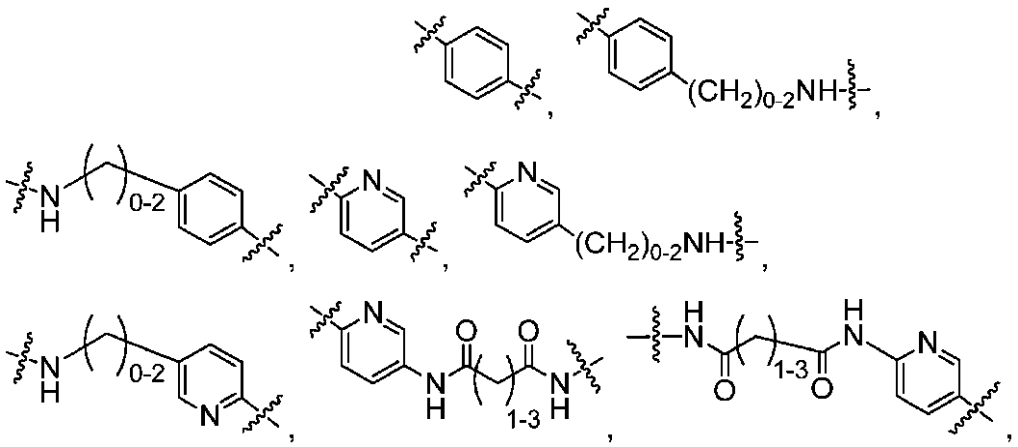
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【０２５９】

【化９６】



から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1～6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８および９から選択され、

Ｌ$_{2}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

Ｌ$_{3}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、

Ｌ$_{4}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーである。

【０２６０】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、－Ｌ$_{1}$－Ｌ$_{2}$－Ｌ$_{3}$－Ｌ$_{4}$－であり、この際、

Ｌ$_{1}$は、結合、－Ａ$_{1}$－、－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－、または－Ｘ^{2}－であり、この際、

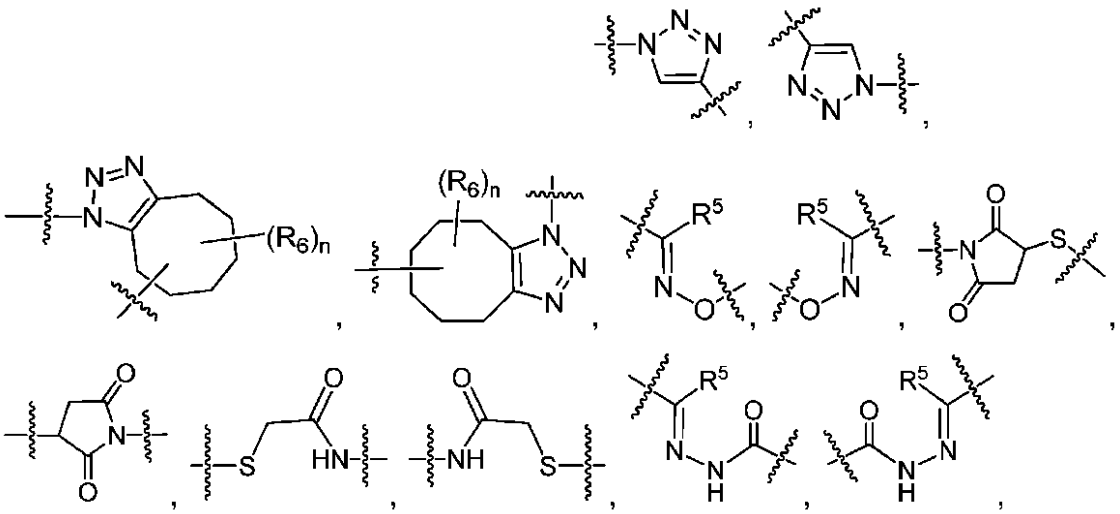
Ａ$_{1}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（

$CH_2)_nS-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$または$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$であり、

各X^2は、独立に、結合、

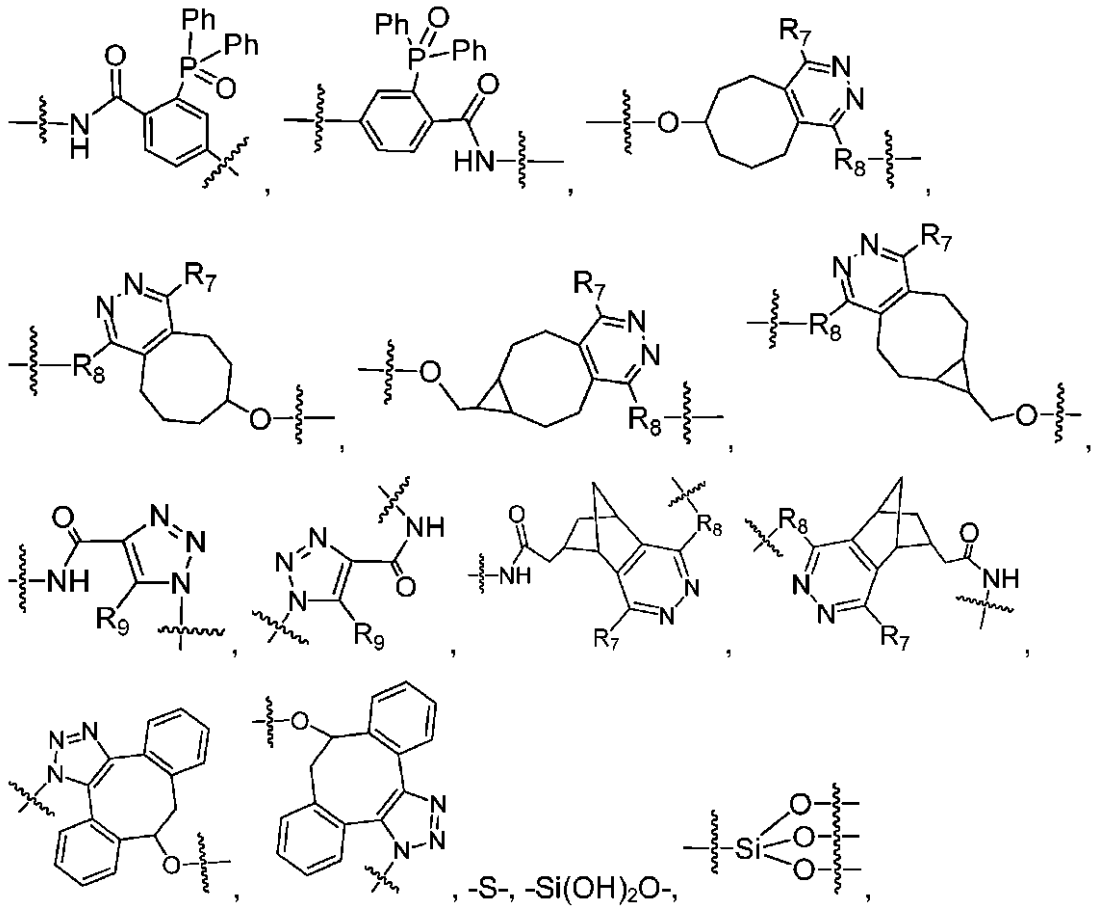
【０２６１】

【化９７】



【０２６２】

【化９８】



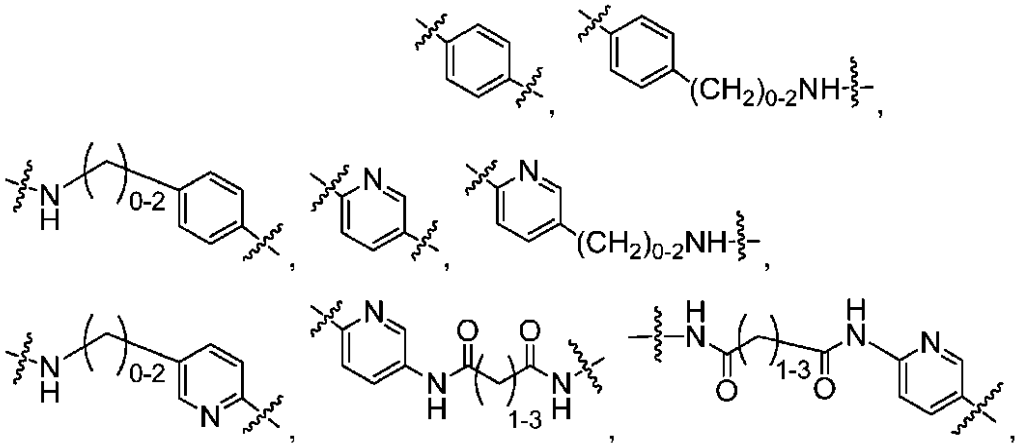
、$-CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-C(=O)NH-$、および$-NHC(=O)-$から選択され、

各R^4は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、$-C(=O)OH$、および$-OH$から選択

され、
各R^5は、独立に、H、$C_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
各R^6は、独立に、H、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、
R^7は、独立に、H、フェニル、およびピリジンから選択され、
R^8は、独立に、

【０２６３】

【化９９】



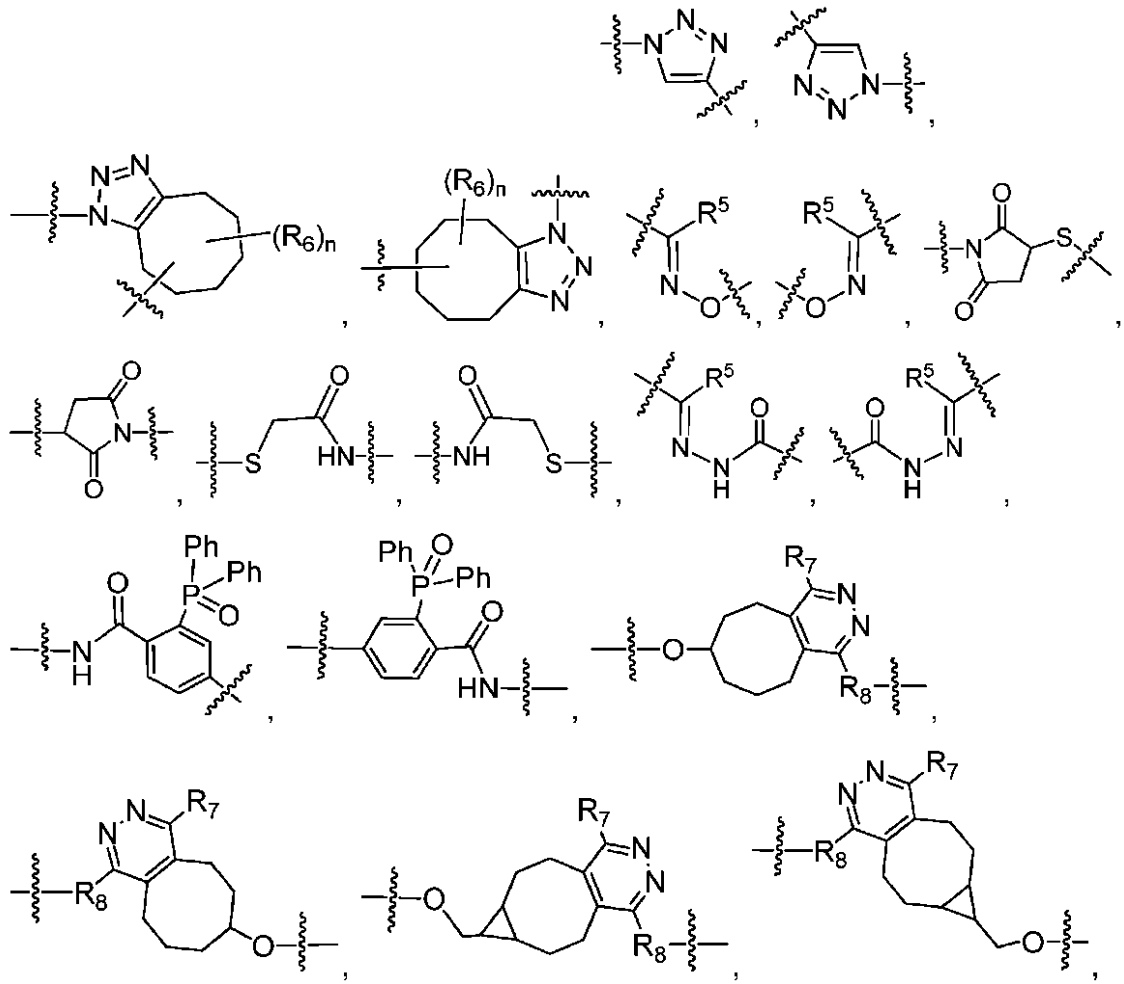
から選択され、
R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８および９から選択され、
L_2は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、
L_3は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、
L_4は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーである。

【０２６４】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、$-L_1-L_2-L_3-L_4-$であり、この際、
L_1は、結合、$-A_1-$、$-A_1X^2-$、または$-X^2-$であり、この際、
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－または－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－であり、
各X^2は、独立に、結合、

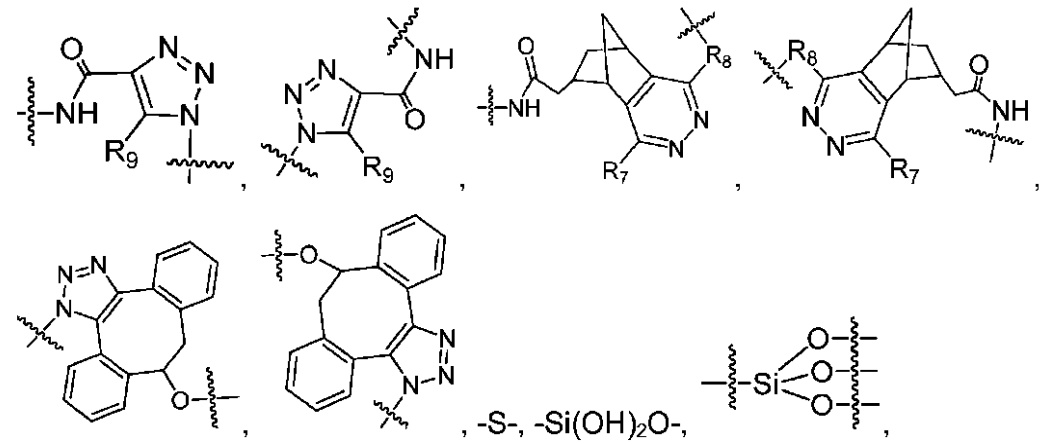
【０２６５】

【化１００】



【０２６６】

【化１０１】



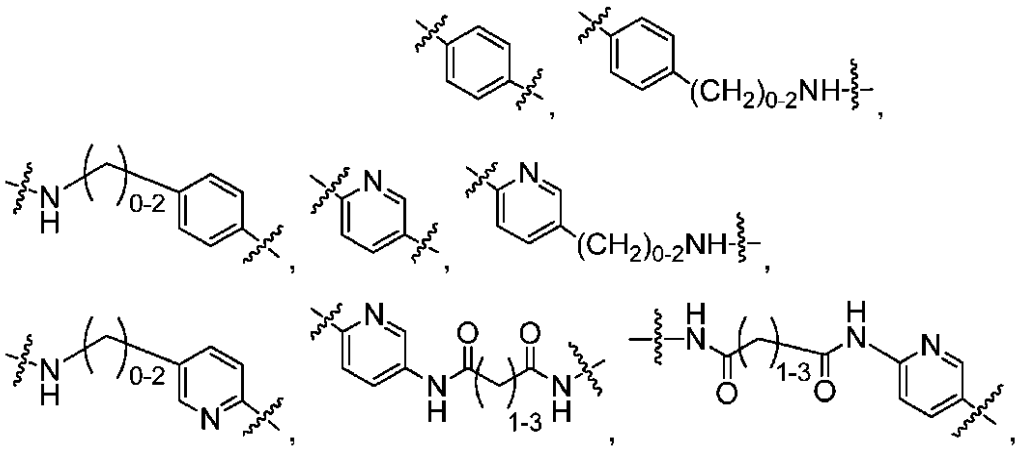
、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

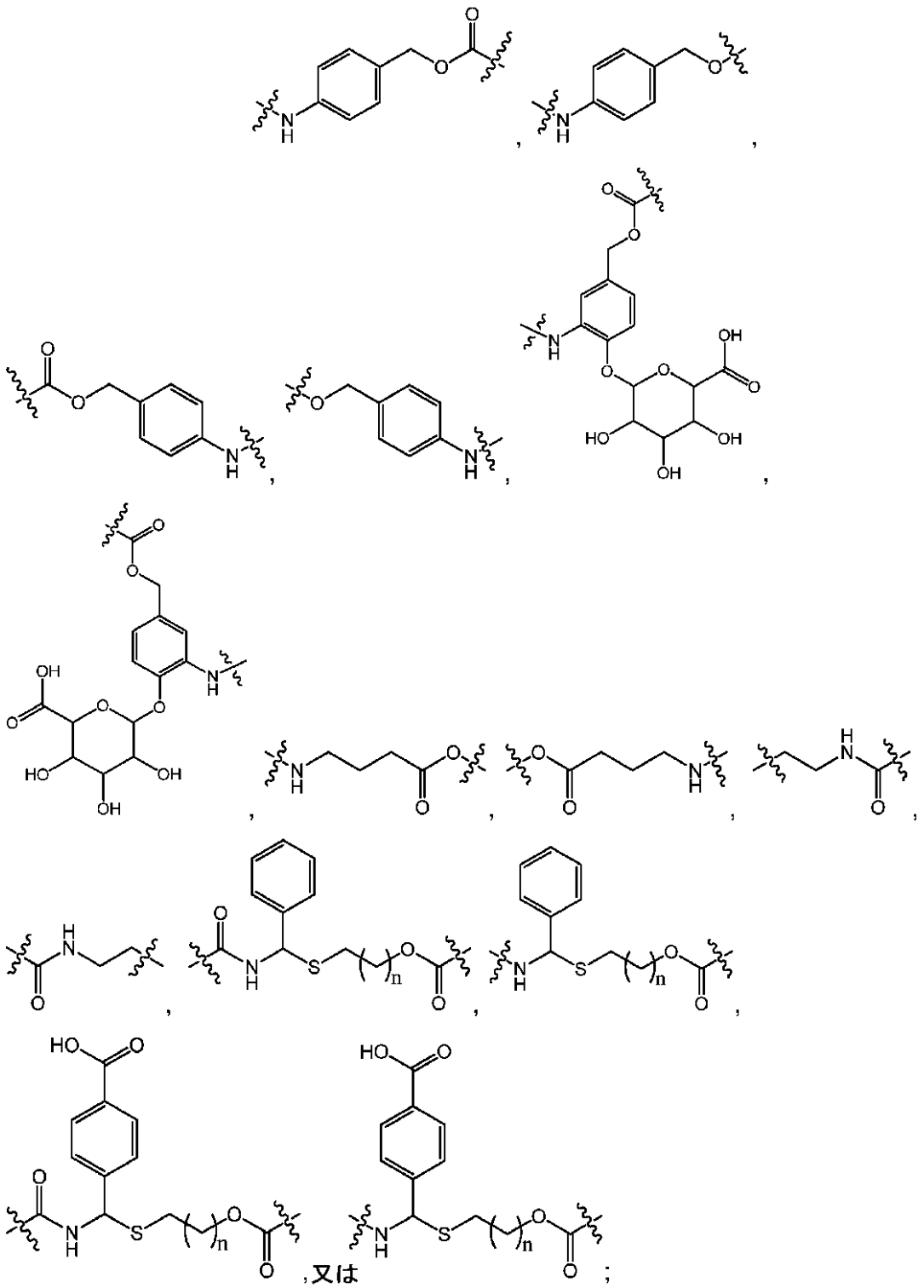
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択さ

れ、
Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、
Ｒ^{8}は、独立に、
【０２６７】
【化１０２】



から選択され、
Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８および９から選択され、
Ｌ$_{2}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、または切断不可能なリンカーであり、
Ｌ$_{3}$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、または切断不可能なリンカーであり、
Ｌ$_{4}$は、結合、酵素的に切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーである。
【０２６８】
ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、－Ｌ$_{1}$－Ｌ$_{2}$－Ｌ$_{3}$－Ｌ$_{4}$－であり、この際、
Ｌ$_{1}$は、結合、－Ａ$_{1}$－、－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－、または－Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{2}$は、結合、－Ａ$_{2}$－、または－Ａ$_{2}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{3}$は、結合、－Ａ$_{3}$－、または－Ａ$_{3}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{4}$は、結合、－Ａ$_{4}$－、－Ａ$_{4}$Ｘ^{2}－、
【０２６９】

【化１０３】



であり、

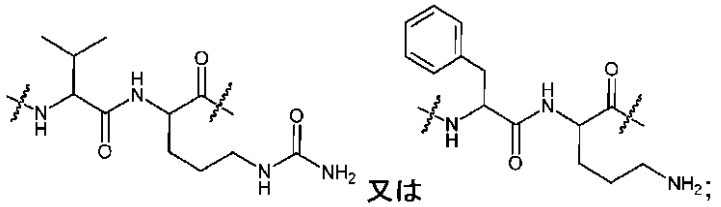
A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（

＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－であり、

Ａ$_2$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^4－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、

【０２７０】

【化１０４】



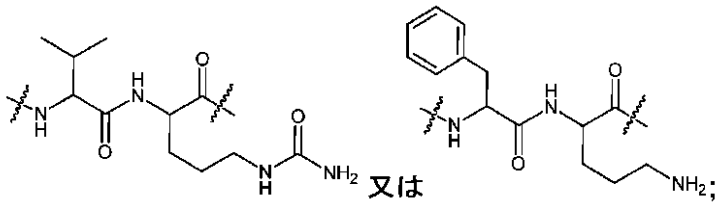
であり、

Ａ$_3$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（

$CH_2)_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$OC（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、

【０２７１】

【化１０５】



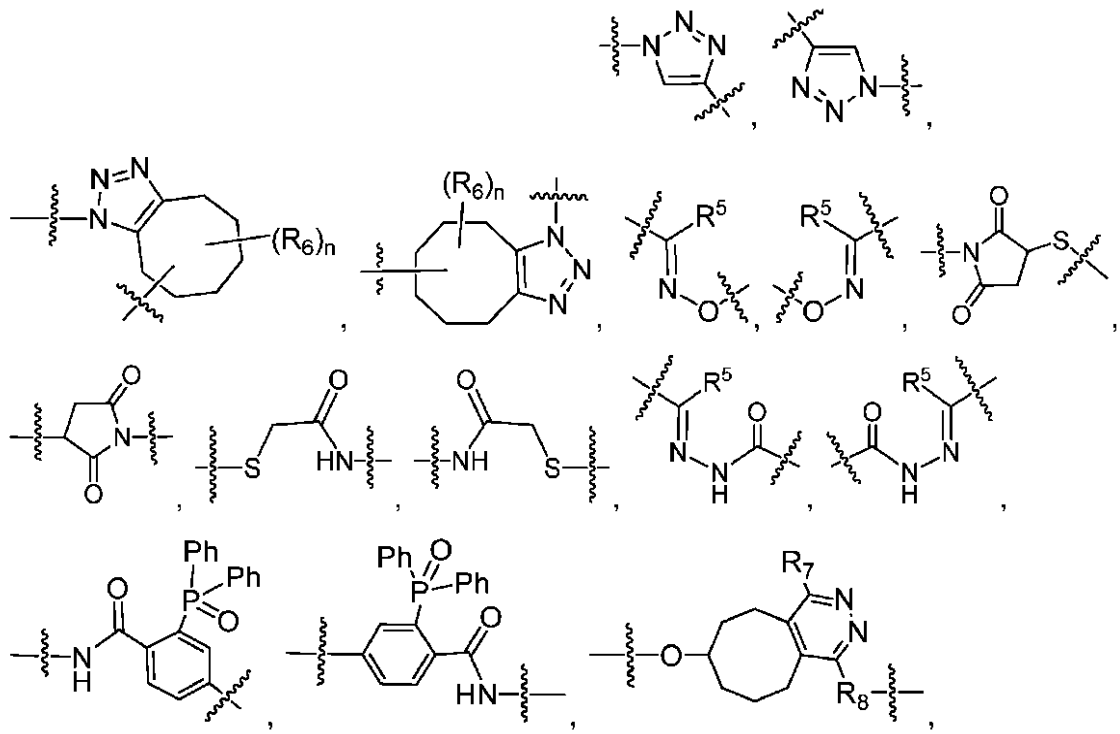
であり、

A_4は、－C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$－、－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$－、－（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）－、－NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$S－、－S（CH_2）$_n$C（＝O）NH－、－S（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH_2）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH_2）$_n$（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$NH（（CH_2）$_n$O）$_m$（CH_2）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH_2）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH_2）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^2は、独立に、結合、

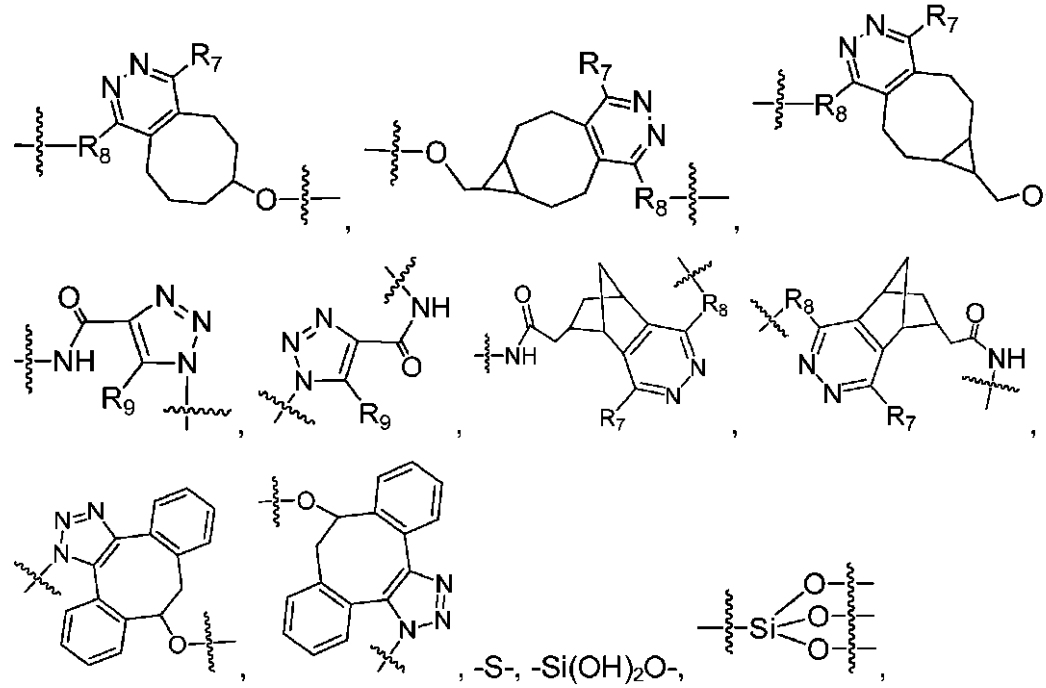
【０２７２】

【化１０６】



【０２７３】

【化１０７】



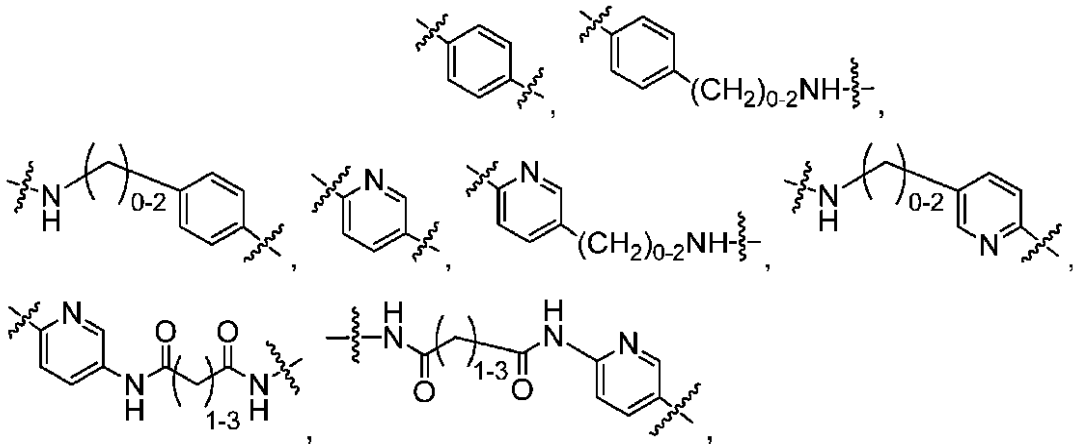
、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

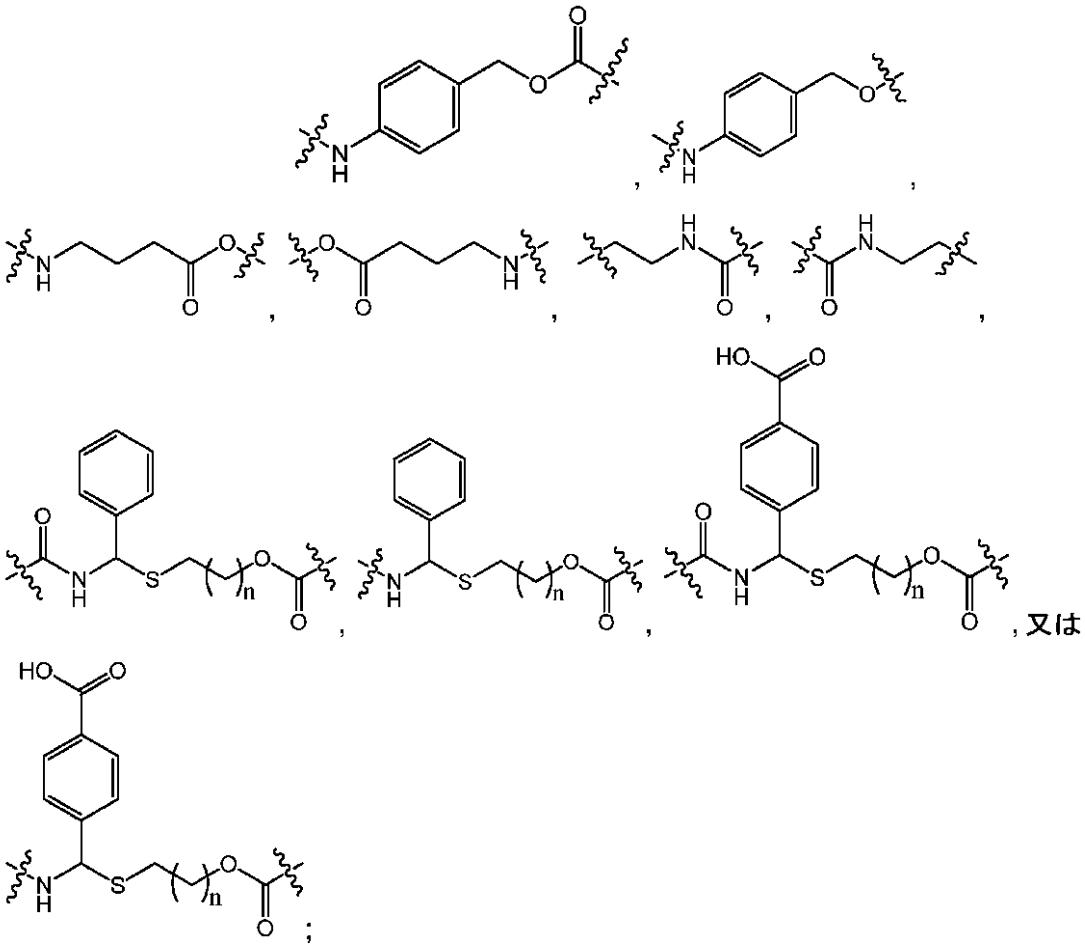
各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択さ

れ、
Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、
Ｒ^{8}は、独立に、
【０２７４】
【化１０８】



から選択され、
Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。
【０２７５】
ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、－Ｌ$_{1}$－Ｌ$_{2}$－Ｌ$_{3}$－Ｌ$_{4}$－であり、この際、
Ｌ$_{1}$は、結合、－Ａ$_{1}$－、－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－、または－Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{2}$は、結合、－Ａ$_{2}$－、または－Ａ$_{2}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{3}$は、結合、－Ａ$_{3}$－、または－Ａ$_{3}$Ｘ^{2}－であり、
Ｌ$_{4}$は、結合、－Ａ$_{4}$－、－Ａ$_{4}$Ｘ^{2}－、
【０２７６】

【化１０９】



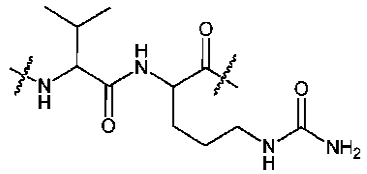
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$Ｓ－、－Ｓ$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨ$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－または－$(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$Ｓ－、－Ｓ$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨ$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－または

【０２７７】

【化１１０】

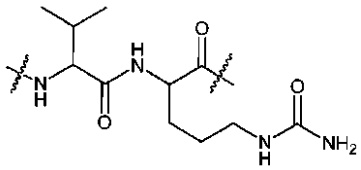


であり、

A_3は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$Ｓ－、－Ｓ$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨ$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－または

【０２７８】

【化１１１】



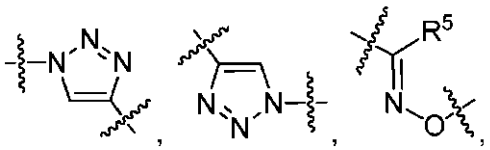
であり、

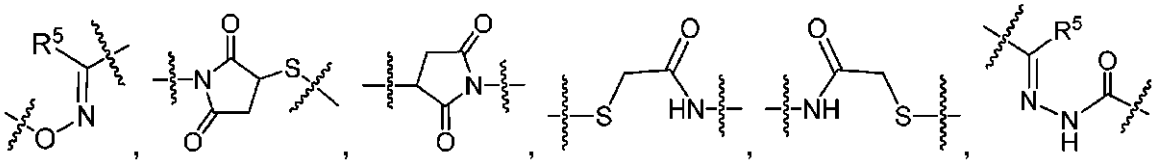
A_4は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$Ｓ－、－Ｓ$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨ$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－または－$(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－であり、

各X^2は、独立に、結合、

【０２７９】

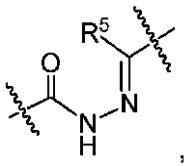
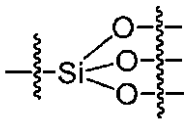
【化１１２】





【０２８０】

【化１１３】


, -S-, -Si(OH)$_2$O-,

, -CHR^4(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,

、－ＣＨＲ^4（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1\sim4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1\sim4}$アルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。

【０２８１】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、－Ｌ$_1$－Ｌ$_2$－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－であり、この際、

Ｌ$_1$は、結合、－Ａ$_1$－、－Ａ$_1$Ｘ^2－、または－Ｘ^2－であり、

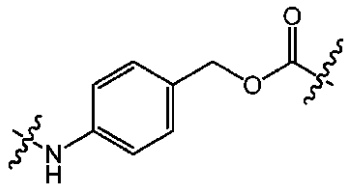
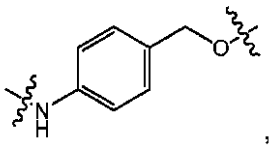
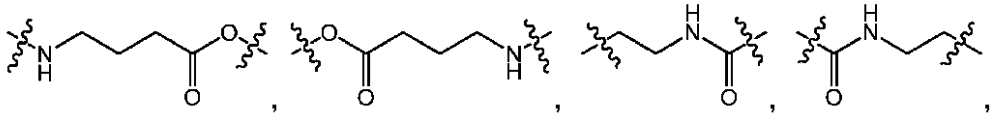
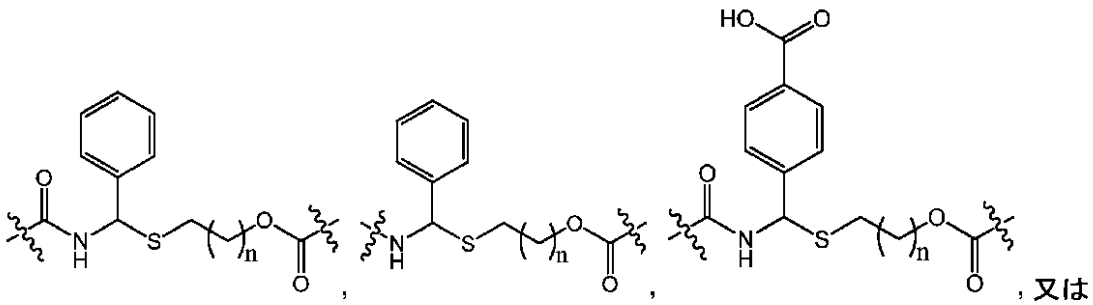
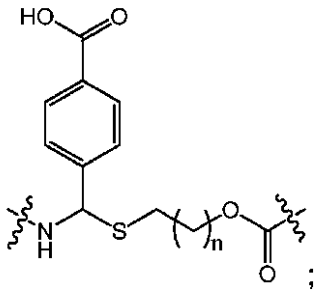
Ｌ$_2$は、結合、－Ａ$_2$－、または－Ａ$_2$Ｘ^2－であり、

Ｌ$_3$は、結合、－Ａ$_3$－、または－Ａ$_3$Ｘ^2－であり、

Ｌ$_4$は、結合、－Ａ$_4$－、－Ａ$_4$Ｘ^2－、

【０２８２】

【化１１４】


,

,

,

,又は

;

であり、

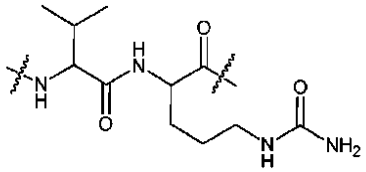
Ａ$_1$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（

$CH_2)_nS-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$または$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$であり、

A_2は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$または

【０２８３】

【化１１５】

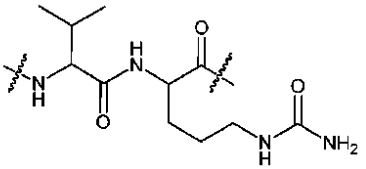


であり、

A_3は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$または

【０２８４】

【化１１６】



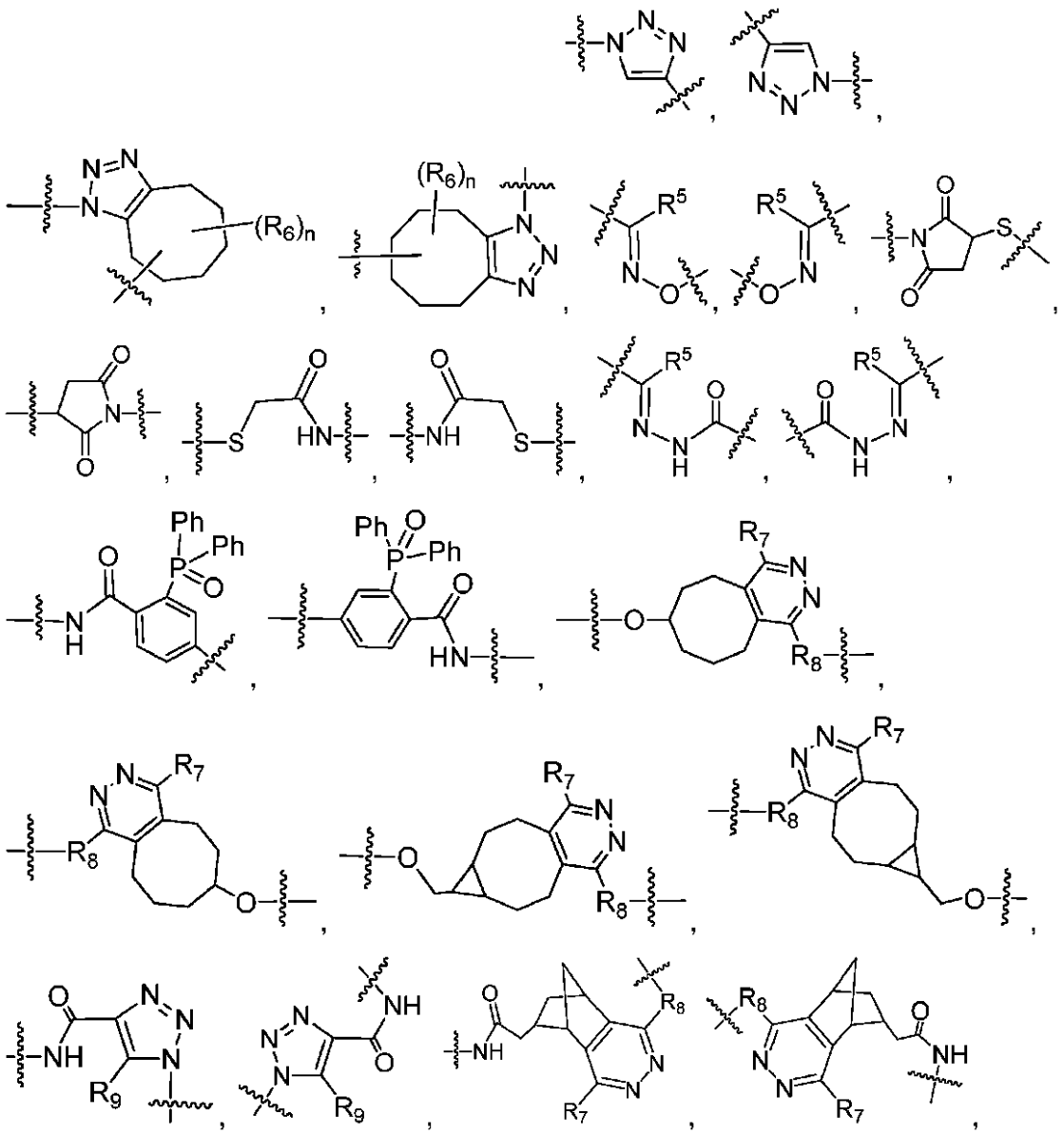
であり、

A_4は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$または$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$であり、

各X^2は、独立に、結合、

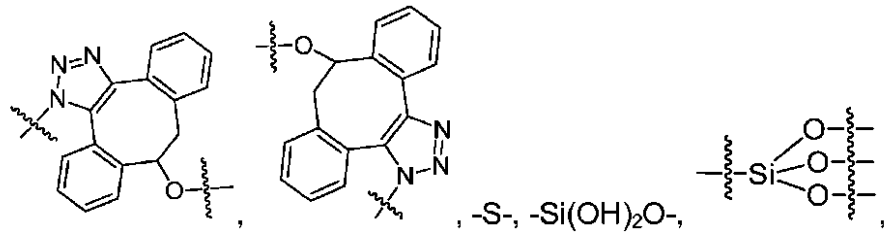
【０２８５】

【化１１７】



【０２８６】

【化１１８】



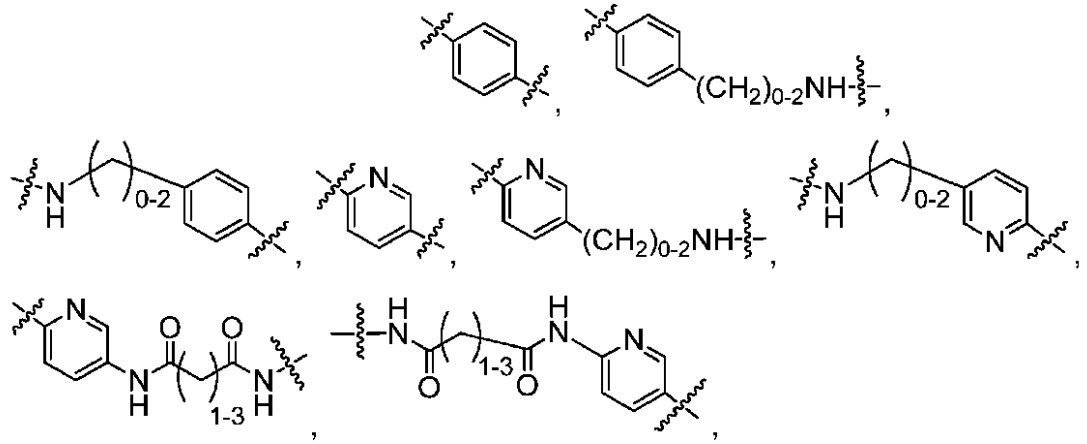
、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

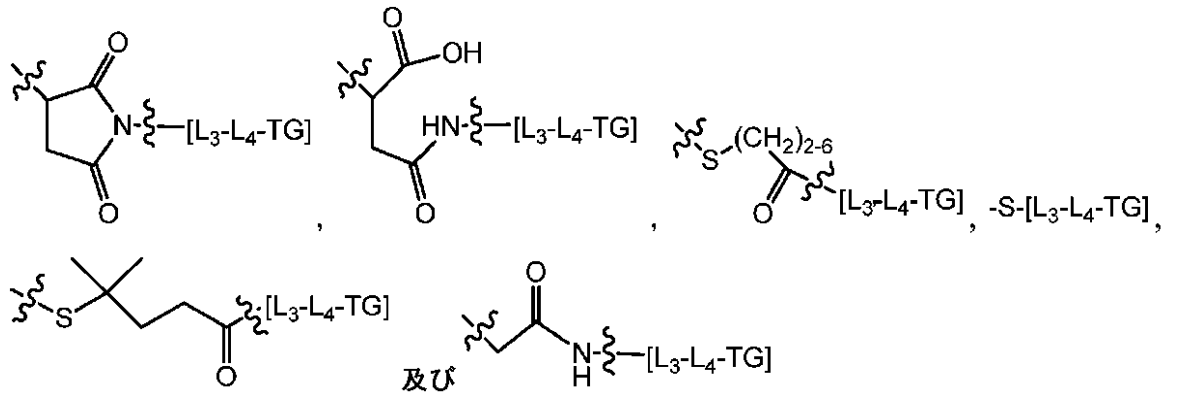
各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択され、

各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1～4}$アルキルから選択さ

れ、
Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、
Ｒ^{8}は、独立に、
【０２８７】
【化１１９】



から選択され、
Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、
各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される。
【０２８８】
本明細書に記載の化合物または方法のいずれかのある特定の実施形態では、Ｌ$_{1}$は、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｓ－［Ｌ$_{2}$－Ｌ$_{3}$－Ｌ$_{4}$－ＴＧ］である（［Ｌ$_{2}$－Ｌ$_{3}$－Ｌ$_{4}$－ＴＧ］などの括弧内に示されているこれらの式の部分は、その式のどの空き原子価（open valence）が括弧に囲まれた構造の残りの部分に結合しているかを同定するために、記載されている式に加えられている）。
【０２８９】
本明細書に記載の化合物または方法のいずれかのある特定の実施形態では、Ｌ$_{2}$は、
【０２９０】
【化１２０】

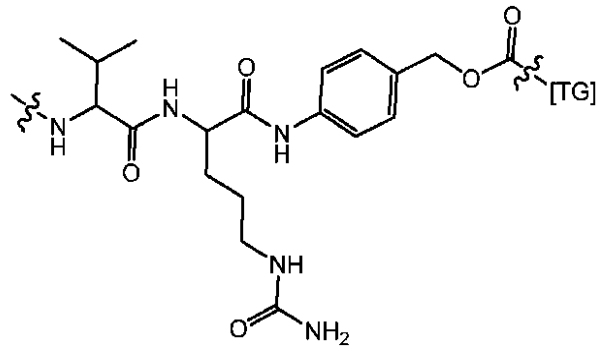


から選択される。
【０２９１】
本明細書に記載の化合物または方法のいずれかのある特定の実施形態では、Ｌ$_{3}$は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{2\sim6}$－Ｃ（＝Ｏ）－［Ｌ$_{4}$－ＴＧ］；－（ＣＨ$_{2}$）$_{2\sim6}$－ＮＨ－［Ｌ$_{4}$－ＴＧ］；－（ＣＨ$_{2}$）$_{2\sim6}$－Ｓ－［Ｌ$_{4}$－ＴＧ］；－（ＣＨ$_{2}$）$_{2\sim6}$－Ｚ－［Ｌ$_{4}$－ＴＧ］；および－（ＣＨ$_{2}$）$_{2\sim6}$－Ｚ－Ｃ（＝Ｏ）－［Ｌ$_{4}$－ＴＧ］から選択され、この際、Ｚは、Ｏ、ＮＨ、またはＳである。
【０２９２】

本明細書に記載の化合物または方法のいずれかのある特定の実施形態では、L_4は、結合または下式のｖａｌ－ｃｉｔリンカー：

【０２９３】

【化１２１】



である。L_4がｖａｌ－ｃｉｔリンカーである場合、L_3は好ましくは、－（CH_2）$_{2\sim6}$－Ｃ（＝Ｏ）－である。

【０２９４】

本明細書に記載の化合物または方法のいずれかのある特定の実施形態では、ＴＧは、ＤＭ１もしくはＤＭ４などのマイタンシノイド、またはドロスタチン（dolostatin）１０化合物、例えば、オーリスタチンＭＭＡＦもしくはＭＭＡＥ、またはＮ－アセチル－γ－カリチアマイシンなどのカリチアマイシン、またはローダミンもしくはテトラメチルローダミンなどの標識もしくは色素である。

【０２９５】

本明細書で使用する場合、「リンカー」は、抗体またはその断片を末端基に連結することが可能な任意の化学的部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性を維持する条件で、酸誘発切断、光誘発切断、ペプチダーゼ誘発切断、エステラーゼ誘発切断、およびジスルフィド結合切断などの切断に対して感受性があり得る。別法では、リンカーは、切断に対して実質的に耐性であり得る。リンカーは、自壊的スペーサーを含んでも、含まなくてもよい。

【０２９６】

末端基（ＴＧ）を本明細書において提供する修飾抗体またはその断片とコンジュゲートするために本明細書で使用する非酵素的に切断可能なリンカーの非限定的な例には、酸不安定性リンカー、ジスルフィド部分を含有するリンカー、トリアゾール部分を含有するリンカー、ヒドラジン部分を含有するリンカー、チオエーテル部分を含有するリンカー、ジアゾ部分を含有するリンカー、オキシム部分を含有するリンカー、アミド部分を含有するリンカー、およびアセトアミド部分を含有するリンカーが含まれる。

【０２９７】

末端基（ＴＧ）を本明細書において提供する修飾抗体またはその断片とコンジュゲートするために本明細書で使用する酵素的に切断可能なリンカーの非限定的な例には、これらだけに限定されないが、プロテアーゼによって切断されるリンカー、アミダーゼによって切断されるリンカー、およびβ－グルクロニダーゼによって切断されるリンカーが含まれる。

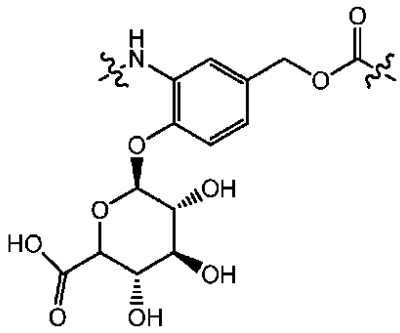
【０２９８】

ある特定の実施形態では、そのような酵素切断可能なリンカーは、カテプシンＺ、カテプシンＢ、カテプシンＨ、およびカテプシンＣを含めたカテプシンによって切断されるリンカーである。ある特定の実施形態では、酵素的に切断可能なリンカーは、カテプシンＺ、カテプシンＢ、カテプシンＨ、またはカテプシンＣによって切断されるジペプチドを含めたカテプシンによって切断されるジペプチドである。ある特定の実施形態では、酵素的に切断可能なリンカーは、カテプシンＢ－切断可能なペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、酵素的に切断可能なリンカーは、カテプシンＢ－切断可能なジペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、酵素的に切断可能なリンカーは、カテプシン

Ｂ－切断可能なジペプチドリンカーであり、これは、バリン－シトルリンまたはフェニルアラニン－リシンである。末端基（ＴＧ）を本明細書において提供する修飾抗体またはその断片とコンジュゲートするために本明細書で使用する酵素的に切断可能なリンカーの他の非限定的な例には、これらだけに限定されないが、β－グルクロニダーゼ－によって切断されるリンカー、例えば、

【０２９９】

【化１２２】



が含まれる。Ducryら、Bioconjugate Chem、vol. 21(1)、5～13 (2010)を参照されたい。

【０３００】

「自壊的スペーサー」は、一方の末端で第１化学部分に、かつ他方の末端で第２化学部分に共有結合していて、それによって、安定なトリパーテート（tripartate）分子を形成している二官能性化学部分である。自壊的スペーサーと第１化学部分との間の結合が切断すると、自壊的スペーサーは、迅速かつ自発的分子内反応を受け、それによって、第２化学部分から分離する。これらの分子内反応は一般に、１，４、または１，６、または１，８除去反応または環化などの電子再編成を伴って、高度に好ましい５員環または６員環を形成する。本発明のある特定の実施形態では、第１部分は、酵素切断可能なリンカーであり、この切断は酵素反応から生じる一方で、他の実施形態では、第１部分は酸不安定性リンカーであり、この切断は、ｐＨ変化によって起こる。本発明に適用する場合、第２部分は、本明細書において定義するとおりの「標識」基である。ある特定の実施形態では、自壊的スペーサーからの第１部分の切断は、タンパク分解酵素による切断から生じる一方で、他の実施形態では、これは、ヒドロラーゼによる切断から生じる。ある特定の実施形態では、自壊的スペーサーからの第１部分の切断は、カテプシン酵素による切断から生じる。

【０３０１】

ある特定の実施形態では、酵素切断可能なリンカーは、ペプチドリンカーであり、自壊的スペーサーは、その一方の末端ではペプチドリンカーに共有結合しており、その他方の末端では、薬物部分に共有結合している。このトリパータイト分子は安定しており、酵素が存在しない状態では、薬理学的に不活性であるが、酵素によって、スペーサー部分およびペプチド部分を共有結合している結合で酵素的に切断可能である。ペプチド部分がトリパーテート分子から切断されると、これは、スペーサー部分の自壊特性を開始して、その結果として、スペーサー部分を薬物部分に共有結合している結合の自発的切断をもたらし、それによって、薬理学的に活性な形態での薬物の放出を実行する。

【０３０２】

末端基（ＴＧ）を本明細書において提供する修飾抗体またはその断片とコンジュゲートする際に任意選択により使用される自壊的スペーサーの非限定的な例には、これらだけに限定されないが、ベンジルカルボニル部分、ベンジルエーテル部分、４－アミノブチラート部分、ヘミチオアミナール部分、またはＮ－アシルヘミチオアミナール部分を含む部分が含まれる。

【０３０３】

自壊的スペーサーの他の例には、これらだけに限定されないが、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル基、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル基と電子的に同様の、２－アミ

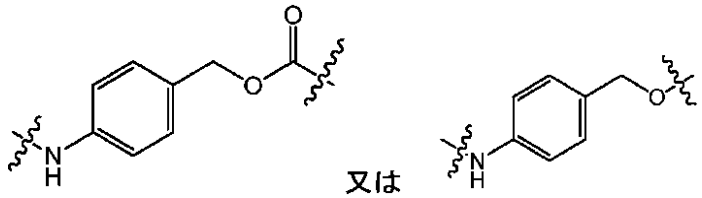
ノイミダゾール－５－メタノール誘導体およびオルトまたはパラ－アミノベンジルアセタールなどの芳香族化合物が含まれる。ある特定の実施形態では、アミド結合加水分解で環化を受ける本明細書で使用する自壊的スペーサーには、置換および非置換の４－アミノ酪酸アミドおよび２－アミノフェニルプロピオン酸アミドが含まれる。

【０３０４】

ある特定の実施形態では、自壊的スペーサーは、

【０３０５】

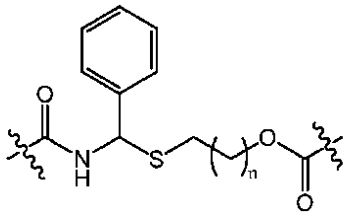
【化１２３】



である一方で、他の実施形態では、自壊的スペーサーは、

【０３０６】

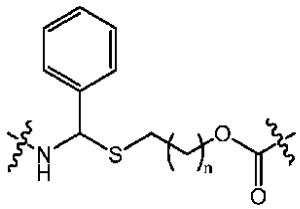
【化１２４】



［式中、ｎは１または２である］である。他の実施形態では、自壊的スペーサーは、

【０３０７】

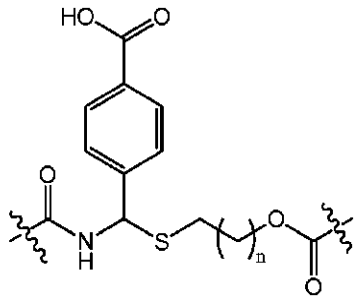
【化１２５】



［式中、ｎは１または２である］である。他の実施形態では、自壊的スペーサーは、

【０３０８】

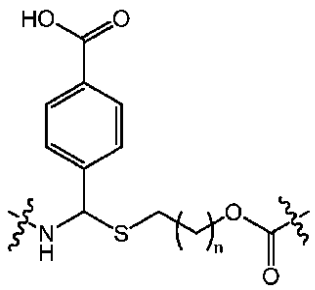
【化１２６】



［式中、ｎは１または２である］である。他の実施形態では、自壊的スペーサーは、

【０３０９】

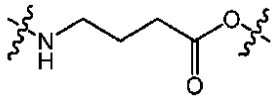
【化１２７】



［式中、ｎは１または２である］である。他の実施形態では、自壊的スペーサーは、

【０３１０】

【化１２８】



［式中、ｎは１または２である］である。

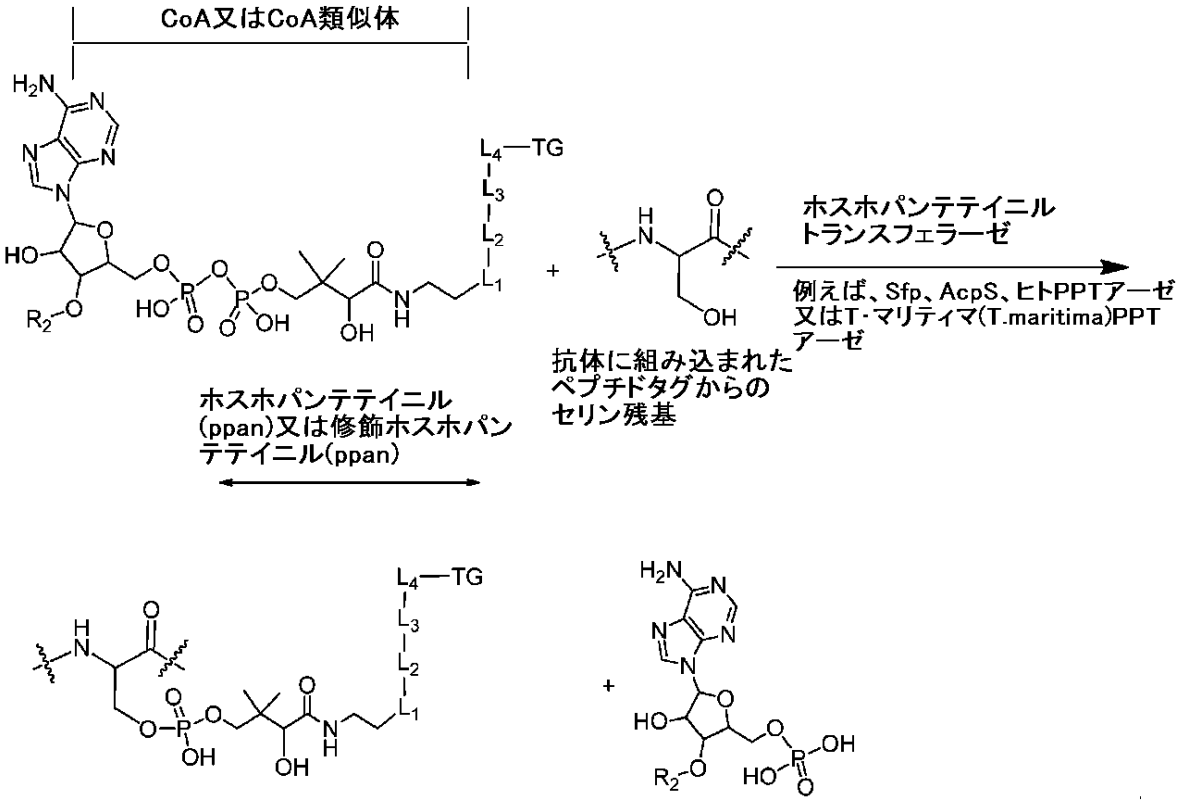
【０３１１】

スキーム（Ｉｂ）は、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片の翻訳後修飾を図示しており、この際、リンカーユニット（ＬＵ）は－Ｌ$_1$－Ｌ$_2$－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－である。

【０３１２】

【化１２９】

スキーム(Ib)



［式中、Ｒ$_2$、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

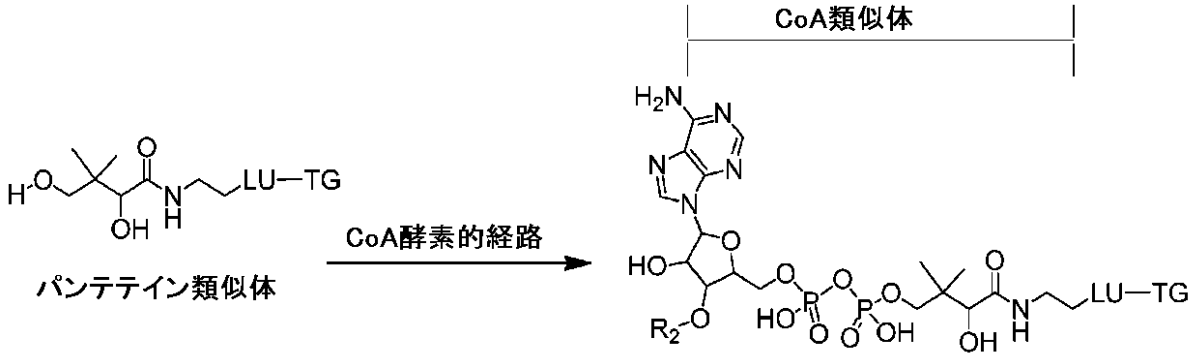
【０３１３】

スキーム（Ｉａ）およびスキーム（Ｉｂ）のＣｏＡ類似体は、全くの化学合成によって

得ることができるが、スキーム（Ｉａ）およびスキーム（Ｉｂ）のＣｏＡ類似体を好ましくは、化学的酵素的プロセスによって得、この際、パンテテイン類似体を化学的に合成し、次いで、対応するＣｏＡ類似体に生合成によって変換する（Kristine M. Clarkeら、「In Vivo Reporter Labeling of Proteins via Metabolic Delivery of Coenzyme A Analogues」、J. Am. Chem. Soc.、2005、127、p. 11234～11235およびJordan L. Meierら、「Synthesis and Evaluation of Bioorthogonal Pantetheine Analogues for in Vivo Protein Modification」、J. Am. Chem. Soc.、2006、128、p. 12174～12184を参照されたい）。スキーム（Ｉａ）のＣｏＡ類似体のための生合成変換を下記に示す：

【０３１４】

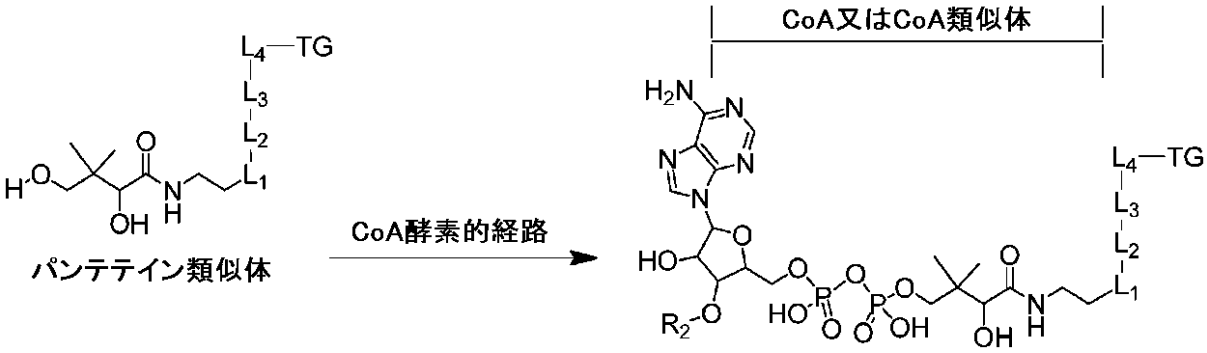
【化１３０】



他方で、スキーム（Ｉｂ）のＣｏＡ類似体のための生合成変換を下記に示す：

【０３１５】

【化１３１】



［式中、ＬＵ、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０３１６】

ある特定の実施形態では、生合成変換は、「インビボ」で起こり、この際、パンテテイン類似体は、周囲の培地から細胞に進入し、それによって、いったん細胞内部で、ＣｏＡ酵素的経路によって、対応するＣｏＡ類似体に変換される。具体的な実施形態では、大腸菌（E. coli）を、対応するＣｏＡ類似体へのパンテテイン類似体の生合成変換のために使用し、この際、パンテテイン類似体は、周囲培地から大腸菌（E. coli）に進入し、いったん細胞内部で、パンテテイン類似体は初めに、パントテン酸キナーゼ（ＰａｎＫまたはＣｏａＡ）によって、アデノシン－５’－三リン酸（ＡＴＰ）を使用してリン酸化され、次いで、ホスホパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ（ＰＰＡＴまたはＣｏａＤ）によってアデニル化されて、デホスホ－ＣｏＡ類似体をもたらし、次いで、さらに、デホスホ補酵素Ａキナーゼ（ＤＰＣＫまたはＣｏａＥ）によってリン酸化されて、ＣｏＡ類似体をもたらす。

【０３１７】

他の実施形態では、生合成変換は「インビトロ」で起こり、この際、酵素的ＣｏＡ経路は、パンテテイン類似体と共に再構成され、それによって、パンテテイン類似体は、再構

成されたＣｏＡ酵素的経路によって「インビトロ」で、対応するＣｏＡ類似体に変換される。「インビトロ」変換の具体的な実施形態では、再構成されたＣｏＡ酵素的経路は、大腸菌（E. coli）ＣｏＡ酵素的経路であり、この際、パンテテイン類似体は初めに、ＣｏａＡおよびＡＴＰによってリン酸化され、次いで、ＣｏａＤによってアデニル化されて、デホスホ－ＣｏＡ類似体をもたらし、次いで、ＣｏａＥによってさらにリン酸化されて、ＣｏＡ類似体をもたらす。

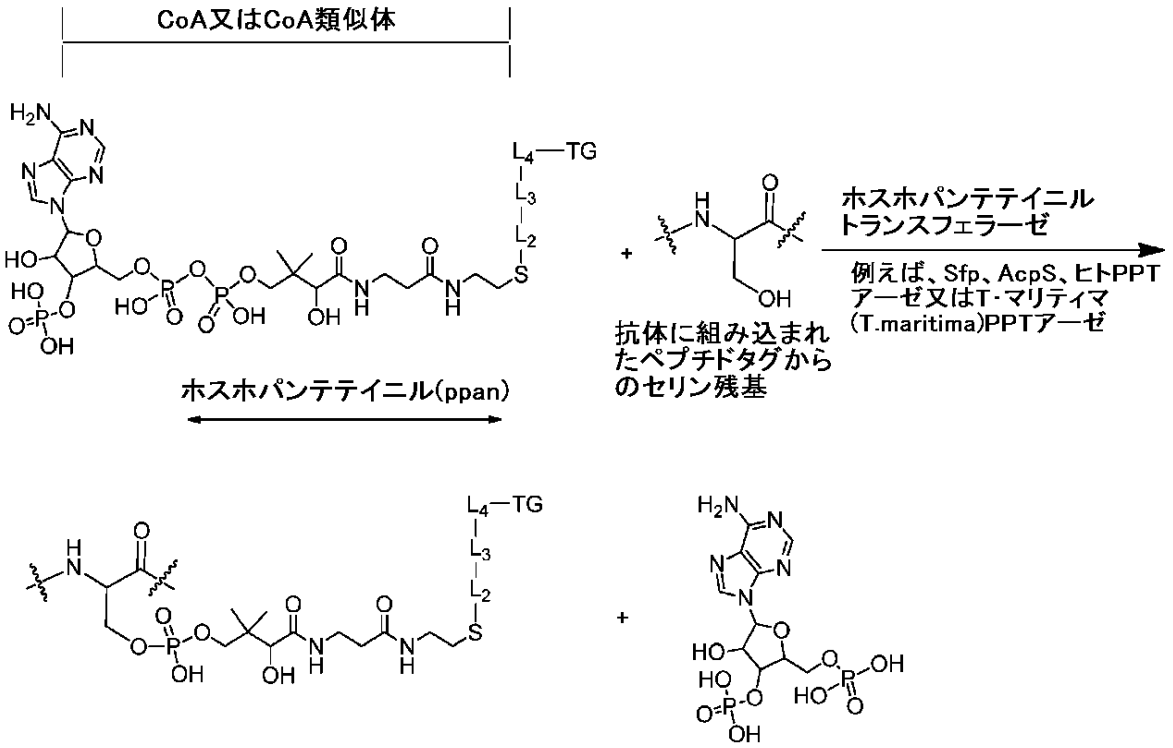
【０３１８】

ある特定の実施形態では、リンカーユニット（ＬＵ）は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_2$Ｓ－L_2－L_3－L_4－であり、R_2は、－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）$_2$であり、そのような実施形態では、末端基は、ＣｏＡに連結している。スキーム（Ｉｃ）は、具体的な実施形態のための、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片の翻訳後修飾を図示しており、この際、ＰＰＴアーゼは、組み込まれた短いペプチドタグ中の保存セリン残基と、補酵素Ａ（ＣｏＡ）に連結している末端基（ＴＧ）との間の反応を触媒する：

【０３１９】

【化１３２】

スキーム(Ic)



［式中、L_2、L_3、L_4、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０３２０】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、スキーム（Ｉａ）、スキーム（Ｉｂ）、およびスキーム（Ｉｃ）に示したとおりの１ステップ法によって部位特異的に標識するが、この際、ＣｏＡまたはＣｏＡ類似体に連結している末端基が、抗体の中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリンと反応する。

【０３２１】

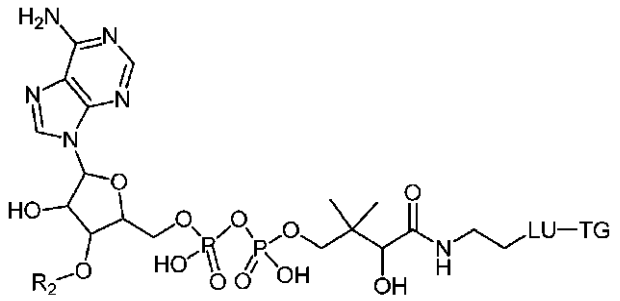
１ステップ法は、

（ａ）小さなペプチドタグを含有するように操作されていて、そのペプチドタグが、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ａ）の構造を有する化合物：

【０３２２】

【化１３３】



式（A）

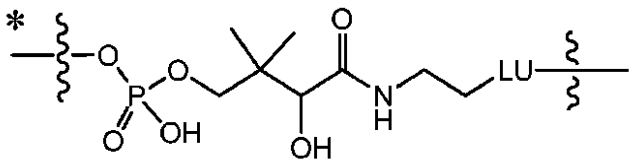
［式中、
Ｒ２、リンカーユニット（ＬＵ）、およびＴＧは、本明細書に記載のとおりである］が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、修飾抗体またはその断片を末端基で標識するステップと
を含む。

【０３２３】

式（Ａ）の化合物を使用するそのような１ステップ法では、それによって、末端基（ＴＧ）を、修飾抗体またはその断片と、式（Ｉ－ａ）による構造を有するリンカーを介してコンジュゲートする。式（Ｉ－ａ）のリンカーは、４’－ホスホパンテテイニル部分と、抗体中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基との間に形成されるホスホジエステル結合によって、小さなペプチドタグに結合する：

【０３２４】

【化１３４】



式（I－a）

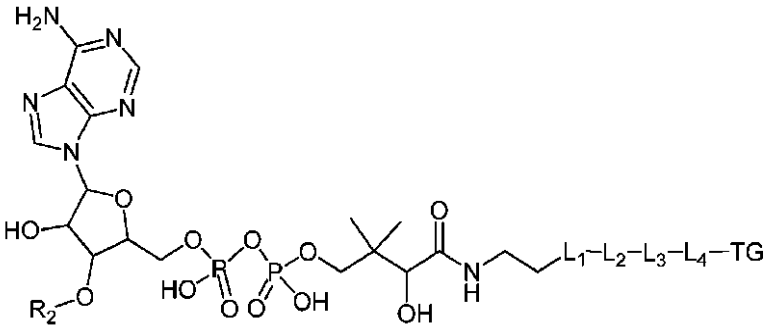
［式中、ＬＵは、本明細書において定義するとおりであり、＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］。

【０３２５】

ある特定の実施形態では、１ステップ法は、
（ａ）小さなペプチドタグを含有するように操作されていて、そのペプチドタグが、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、
（ｂ）式（Ｂ）の構造を有する化合物：

【０３２６】

【化１３５】



式（Ｂ）

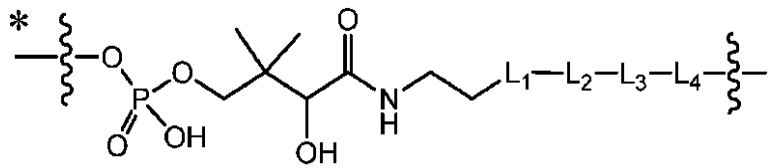
［式中、Ｒ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、修飾抗体またはその断片を末端基で標識するステップと
を含む。

【０３２７】

上記の式（Ｂ）の化合物を使用するそのような１ステップ法では、それによって、末端基を、修飾抗体またはその断片と、式（Ｉ－ｂ）による構造を有するリンカーを介して結合する。式（Ｉ－ｂ）のリンカーは、４’－ホスホパンテテイニル部分と、抗体中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基との間に形成されるホスホジエステル結合によって、小さなペプチドタグに結合する：

【０３２８】

【化１３６】



式（Ｉ－ｂ）

［式中、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、およびＬ４は、本明細書において定義するとおりであり、＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］。

【０３２９】

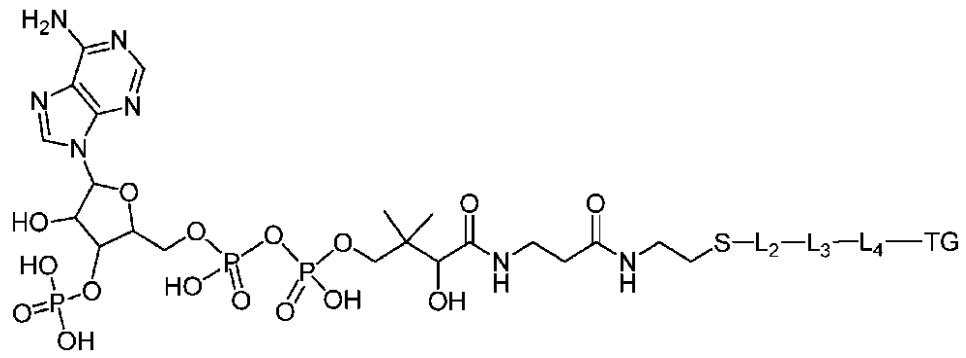
他の実施形態では、１ステップ法は、

（ａ）小さなペプチドタグを含有するように操作されていて、そのペプチドタグが、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｃ）の構造を有する化合物：

【０３３０】

【化１３７】



式（Ｃ）

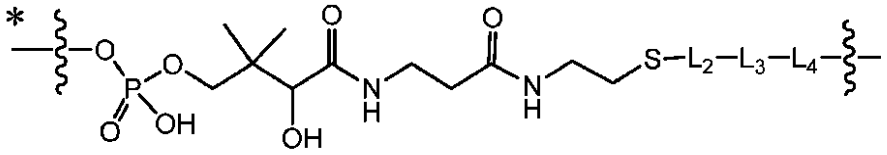
［式中、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートすることによって、修飾抗体またはその断片を末端基で標識するステップと
を含む。

【０３３１】

上記の式（Ｃ）の化合物を使用するそのような１ステップ法では、それによって、末端基を、修飾抗体またはその断片と、式（Ｉ－ｃ）による構造を有するリンカーを介して結合する。式（Ｉ－ｃ）のリンカーは、４’－ホスホパンテテイニル部分と、抗体中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基との間に形成されるホスホジエステル結合によって、小さなペプチドタグに結合する：

【０３３２】

【化１３８】



式（Ｉ－ｃ）

［式中、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、およびＬ$_4$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］。

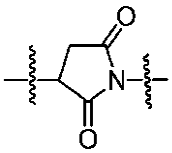
本明細書に記載の１ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、式（Ａ）、式（Ｂ）、または式（Ｃ）の構造を有する化合物、および発現される修飾抗体またはその断片と同じ細胞内で同時発現される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。本明細書に記載の１ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、細胞培地中で、式（Ａ）、式（Ｂ）、または式（Ｃ）の構造を有する化合物、および同じ細胞中または別の細胞中で産生される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。本明細書に記載の１ステップ法のある特定の実施形態では、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素を、固体支持体上に固定化する。ある特定の実施形態では、固体支持体は、任意選択により、ビーズまたはカラム上のポリマーからなる。

【０３３３】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、Ｌ$_1$は－Ａ$_1$Ｘ^2－であり、Ｌ$_2$は結合であり、Ｌ$_3$は結合であり、Ｌ$_4$は－Ａ$_4$－であり、Ａ$_1$は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－であり、Ａ$_4$は、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－であり、Ｘ^{2}は

【０３３４】

【化１３９】



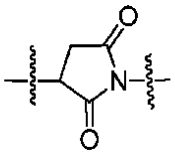
である。

【０３３５】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、A_4は－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－であり、X^2は

【０３３６】

【化１４０】



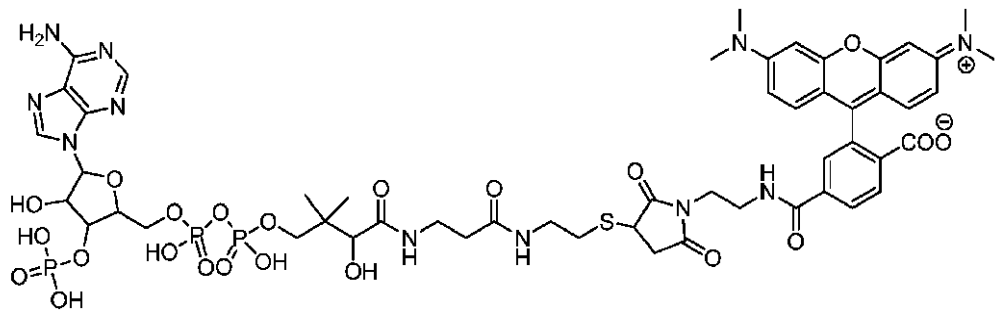
であり、ＴＧは蛍光プローブである。

【０３３７】

ある特定の実施形態では、式（Ｂ）の化合物は、

【０３３８】

【化１４１】



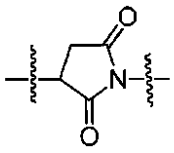
である。

【０３３９】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、A_4は－（CH_2）$_n$C（＝O）－、X^2は

【０３４０】

【化１４２】



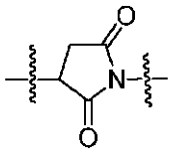
である。

【０３４１】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、A_4は－（CH_2）$_n$C（＝O）－であり、X^2は

【０３４２】

【化１４３】



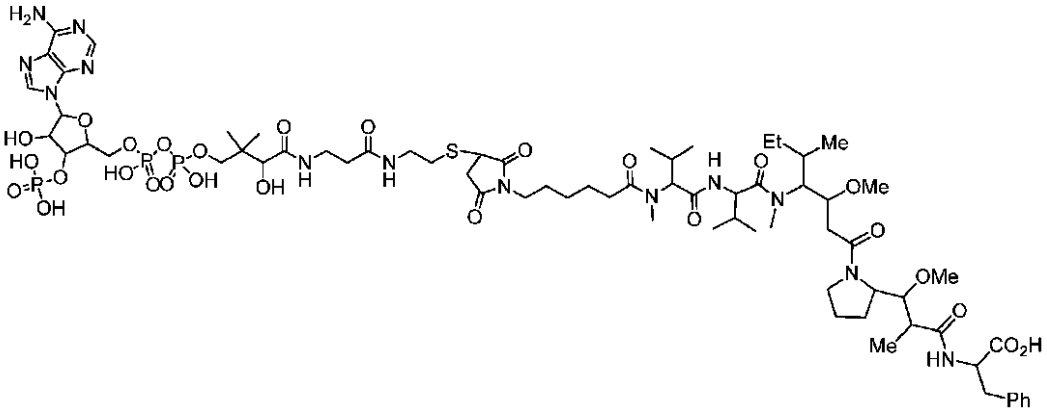
であり、ＴＧは、薬物部分である。

【０３４３】

ある特定の実施形態では、式（Ｂ）の化合物は、

【０３４４】

【化１４４】



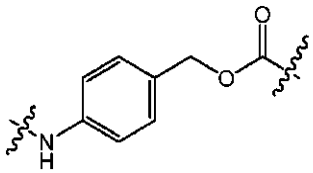
である。

【０３４５】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は－A_2－であり、L_3は－A_3－であり、L_4は

【０３４６】

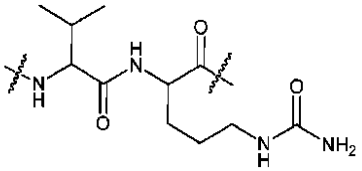
【化１４５】



であり、；A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、A_2は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏであり、A_3は

【０３４７】

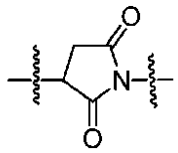
【化１４６】



であり、X^2は、

【０３４８】

【化１４７】



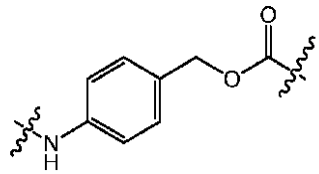
である。

【０３４９】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は－A_2－であり、L_3は－A_3－－であり、L_4は

【０３５０】

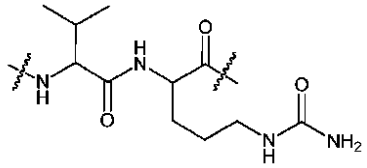
【化１４８】



であり、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、A_2は－（CH_2）$_n$C（＝Oであり、A_3は

【０３５１】

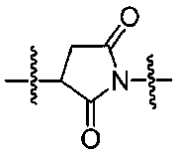
【化１４９】



であり、X^2は

【０３５２】

【化１５０】



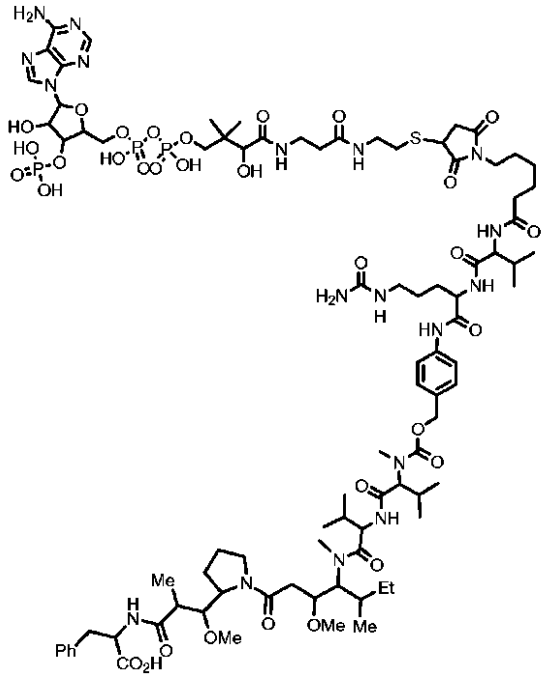
であり、ＴＧは、薬物部分である。

【０３５３】

ある特定の実施形態では、式（Ｂ）の化合物は、

【０３５４】

【化１５１】



である。

【０３５５】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合－であり、L_3は－A_3－であり、L_4は結合であり、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－であり、A_3は－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、X^2は－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－である。

【０３５６】

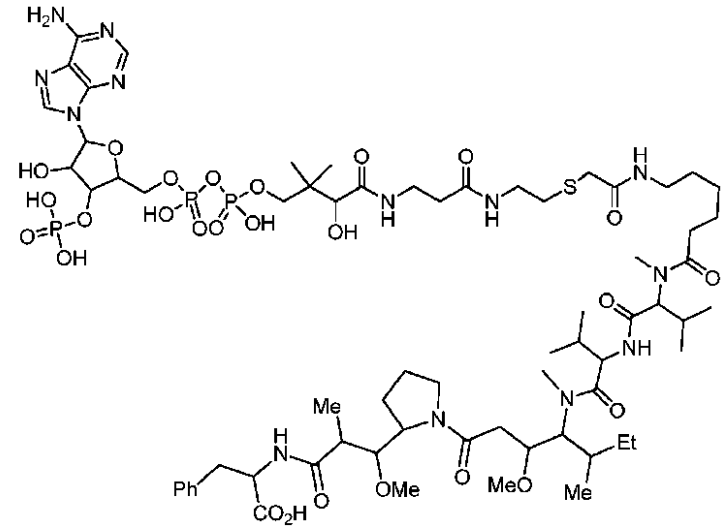
本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合－であり、L_3は－A_3－であり、L_4は結合であり、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－であり、A_3は－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、X^2は－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、ＴＧは薬物部分である。

【０３５７】

ある特定の実施形態では、式（Ｂ）の化合物は、

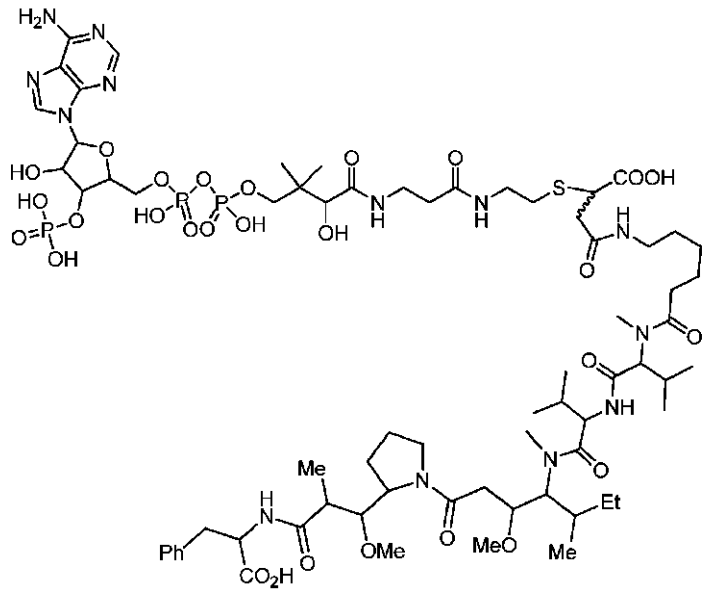
【０３５８】

【化１５２】



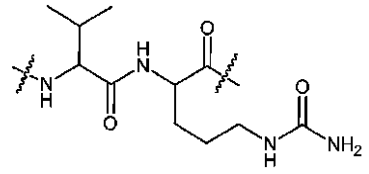
である。

【０３５９】
本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合であり、L_3は－A_3－であり、L_4は結合であり、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$Sであり、A_3は－（CH_2）$_n$C（＝O）－であり、X^2は－CHR^4（CH_2）$_n$C（＝O）NH－であり、R^4は－C（＝O）OHである。
【０３６０】
本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、L_2は結合であり、L_3は－A_3－であり、L_4は結合であり、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$Sであり、A_3は－（CH_2）$_n$C（＝O）－であり、X^2は－CHR^4（CH_2）$_n$C（＝O）NH－であり、R^4は－C（＝O）OHであり、TGは薬物部分である。
【０３６１】
ある特定の実施形態では、式（B）の化合物は、
【０３６２】
【化１５３】



である。
【０３６３】
本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－（CH_2）C（＝O）NH－であり、L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、この際、A_4は－（CH_2）$_n$NHC（＝O）－である。
【０３６４】
本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－（CH_2）C（＝O）NH－であり、L_2は結合であり、L_3は結合であり、L_4は－A_4－であり、この際、A_4は－（CH_2）$_n$C（＝O）－である。
【０３６５】
本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－C（＝O）NH（CH_2）$_n$S－であり、X^2は－（CH_2）C（＝O）NH－であり、L_2は－A_2－であり、この際、A_2は－（CH_2）$_n$C（＝Oであり、L_3は－A_3－であり、この際、A_3は、
【０３６６】

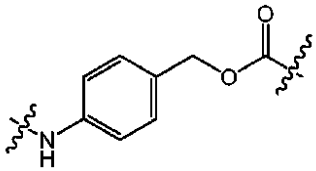
【化１５４】



であり、L_4は、

【０３６７】

【化１５５】



である。

【０３６８】

本明細書において提供する方法、化合物、および免疫コンジュゲートのある特定の実施形態では、L_1は－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、L_2は結合－であり、L_3は－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、L_4は結合である。

【０３６９】

２ステップ法

別法では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、２ステップ法によって部位特異的に標識し、この際、第１のステップでは、官能基（R_1）を含有するＣｏＡのｐｐａｎ補欠分子族またはＣｏＡ類似体の修飾ｐｐａｎ補欠分子族を、４’－ホスホパンテテイニル部分と、抗体に組み込まれている短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基との間に形成されるホスホジエステル結合によって、短いペプチドタグに結合させる。第２のステップでは、官能基（R_1）と反応性である基に連結しているか、または直接結合している末端基（ＴＧ）を、ＣｏＡのｐｐａｎ補欠分子族またはＣｏＡ類似体の修飾ｐｐａｎ補欠分子族上の官能基（R_1）と反応させ、それによって、末端基を修飾抗体またはその断片に直接結合させるか、末端基を修飾抗体またはその断片にリンカーユニット（ＬＵ）を介して結合させる。

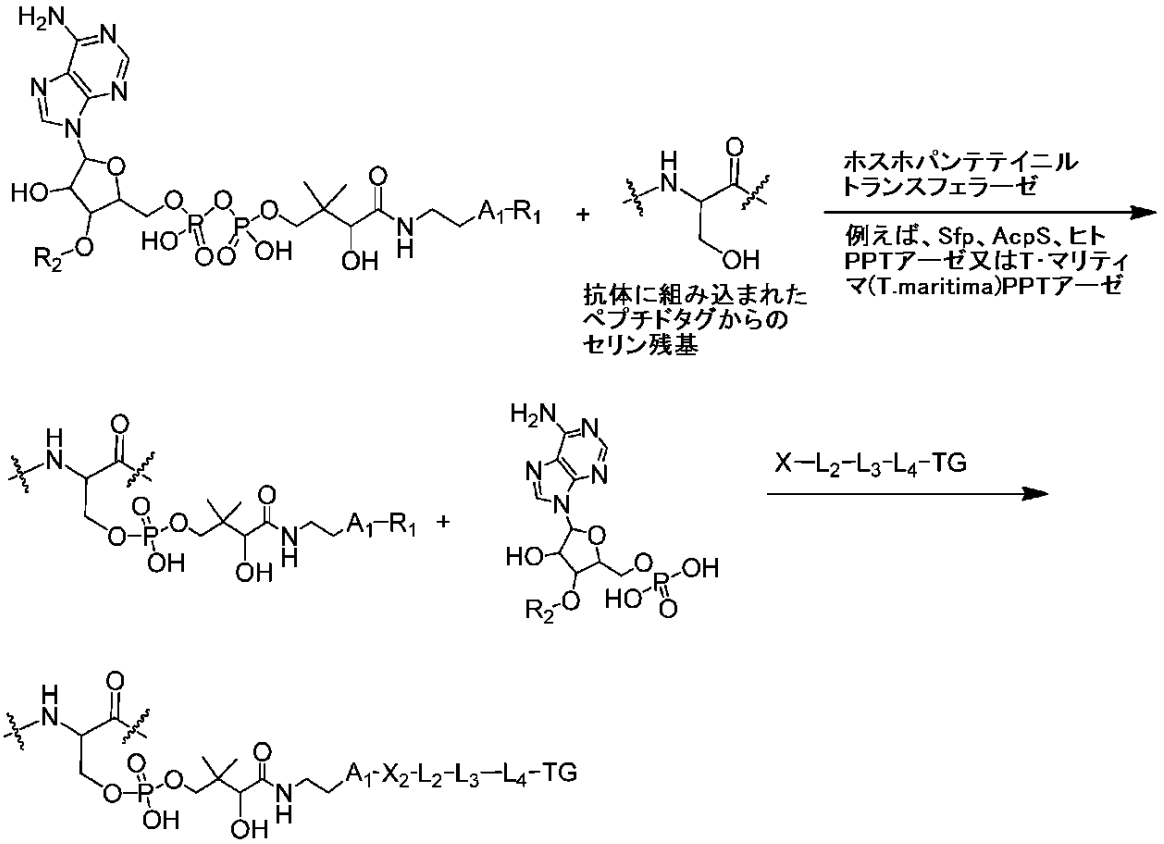
【０３７０】

２ステップ法の一実施形態をスキーム（ＩＩａ）において示す。

【０３７１】

【化１５６】

スキーム(IIa)



［式中、Ｘおよび対応するＲ１は、下記の表３に示すとおりであり、Ｒ２、Ａ１、Ｌ２、Ｘ２、Ｌ３、Ｌ４、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである：

【０３７２】

【表３】

表3

X	R_1
チオール	チオール、マレイミド、またはハロアセトアミド
アジド	アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、またはオキサノルボルナジエン
トリアリールホスフィン	アジド
オキサノルボルナジエン	アジド
アルキン	アジド
アルケン	アジド
シクロオクテン	ジアリールテトラジン
ジアリールテトラジン	シクロオクテン
モノアリールテトラジン	ノルボルネン
ノルボルネン	モノアリールテトラジン
アルデヒド	ヒドロキシルアミンまたはヒドラジンまたはNH_2−NH−C(=O)−
ケトン	ヒドロキシルアミンまたはヒドラジンまたはNH_2−NH−C(=O)−
ヒドロキシルアミン	アルデヒドまたはケトン
ヒドラジン	アルデヒドまたはケトン
NH_2−NH−C(=O)−	アルデヒドまたはケトン
ハロアセトアミド	チオール
マレイミド	チオール

【０３７３】

ＸおよびＲ$_1$のアルケン、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、オキサノルボルナジエン、ジアリールテトラジン、モノアリールテトラジン、およびノルボルネンは、置換されていてもよい。

【０３７４】

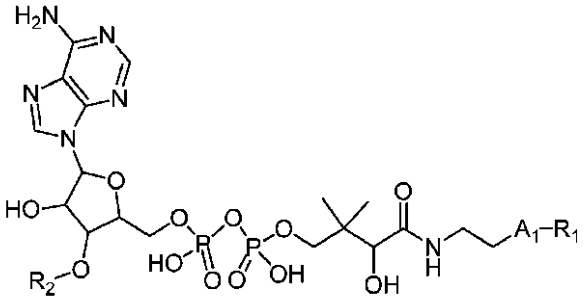
スキーム（ＩＩａ）の２ステップ法は、

（ａ）ペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｄ）の化合物

【０３７５】

【化１５７】

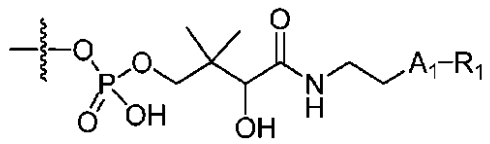


式（Ｄ）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｄ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基

【０３７６】

【化１５８】



式（Ｄ－ａ）

をペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩａ）の化合物：

Ｘ－Ｌ$_2$－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－ＴＧ

式（ＩＩ－ａ）

［式中、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ａ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

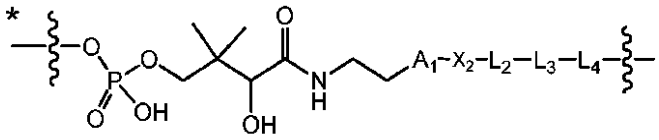
を含む。

【０３７７】

スキーム（ＩＩａ）の２ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩｂ）による構造を有するリンカー：

【０３７８】

【化１５９】



式(II－b)

［式中、A_1、X_2、L_2、L_3、およびL_4は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

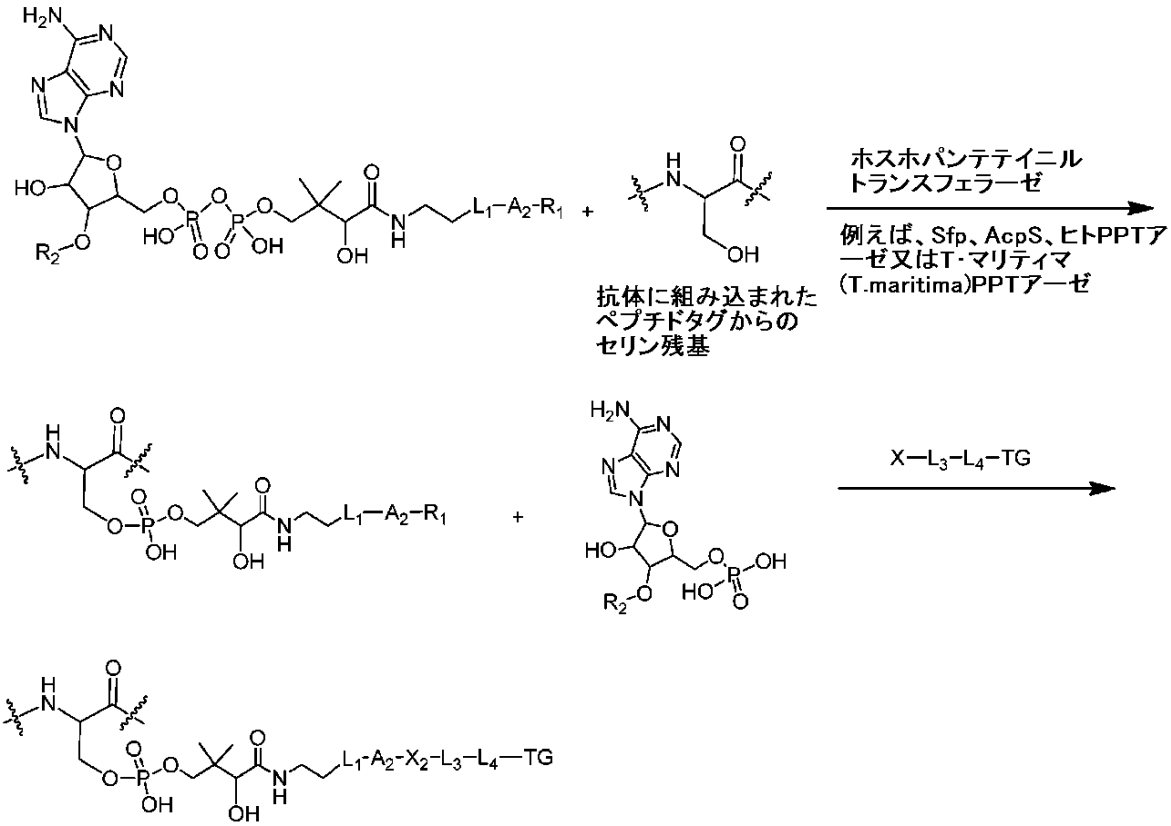
【０３７９】

２ステップ法の別の実施形態をスキーム（ＩＩｂ）に示す。

【０３８０】

【化１６０】

スキーム(IIb)



［式中、Ｘ、R_1、R_2、L_1、A_2、X_2、L_3、L_4、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０３８１】

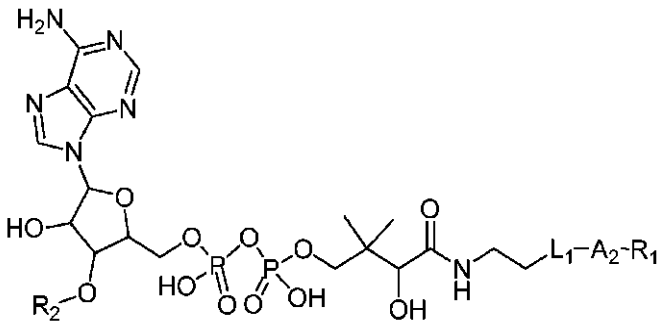
スキーム（ＩＩｂ）の２ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｅ）の化合物

【０３８２】

【化１６１】

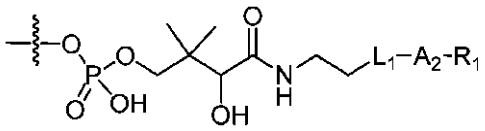


式（E）

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｅ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基

【０３８３】

【化１６２】



式（E－a）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩ－ｃ）の化合物：

Ｘ－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－ＴＧ

式（ＩＩ－ｃ）

［式中、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｌ$_1$、Ａ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

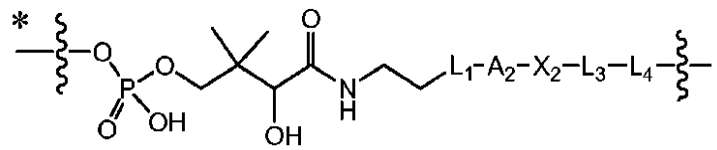
を含む。

【０３８４】

スキーム（ＩＩｂ）の２ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩ－ｄ）による構造を有するリンカー：

【０３８５】

【化１６３】



式（II－d）

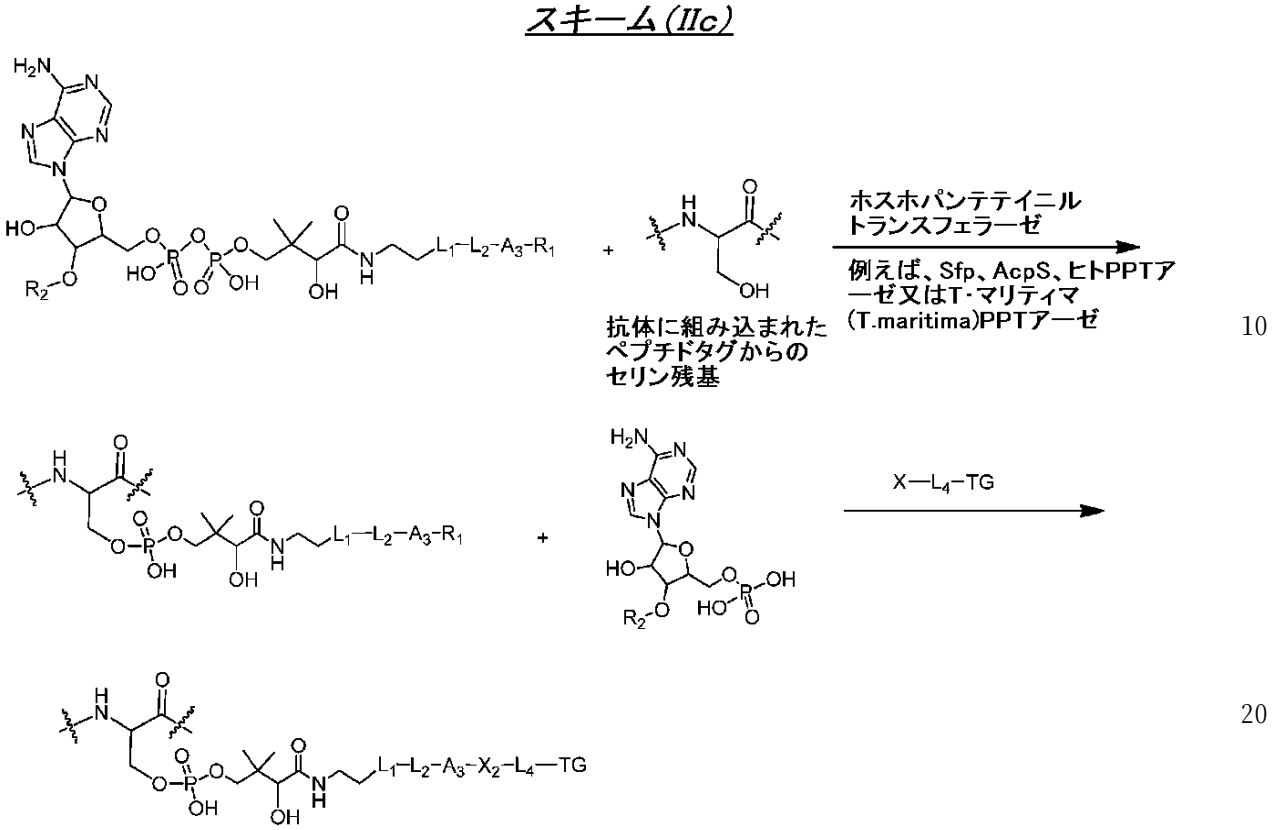
［式中、Ｌ$_1$、Ａ$_2$、Ｘ$_2$、Ｌ$_3$、およびＬ$_4$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

【０３８６】

２ステップ法の別の実施形態をスキーム（ＩＩ－ｃ）に示す。

【０３８７】

【化１６４】



［式中、Ｘ、Ｒ１、Ｒ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｘ２、Ａ３、Ｌ４、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０３８８】

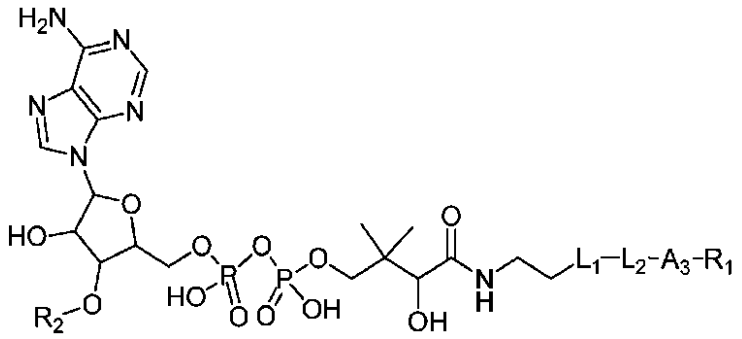
スキーム（ＩＩｃ）の２ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｆ）の化合物

【０３８９】

【化１６５】

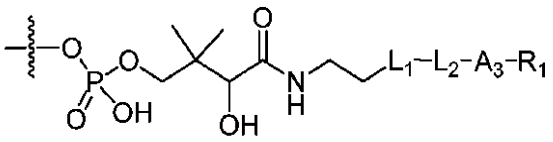


式(F)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｆ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基

【０３９０】

【化１６６】



式（Ｆ－ａ）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩｅ）の化合物：

Ｘ－Ｌ$_4$－ＴＧ

式（ＩＩ－ｅ）

［式中、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

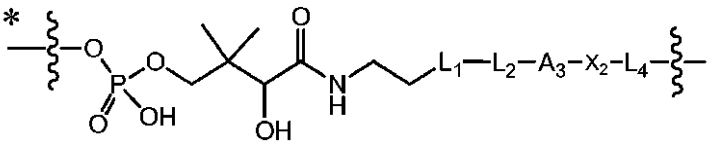
を含む。

【０３９１】

スキーム（ＩＩｃ）の２ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩ－ｆ）による構造を有するリンカー：

【０３９２】

【化１６７】



式（II－f）

［式中、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ａ$_3$、Ｘ$_2$、およびＬ$_4$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

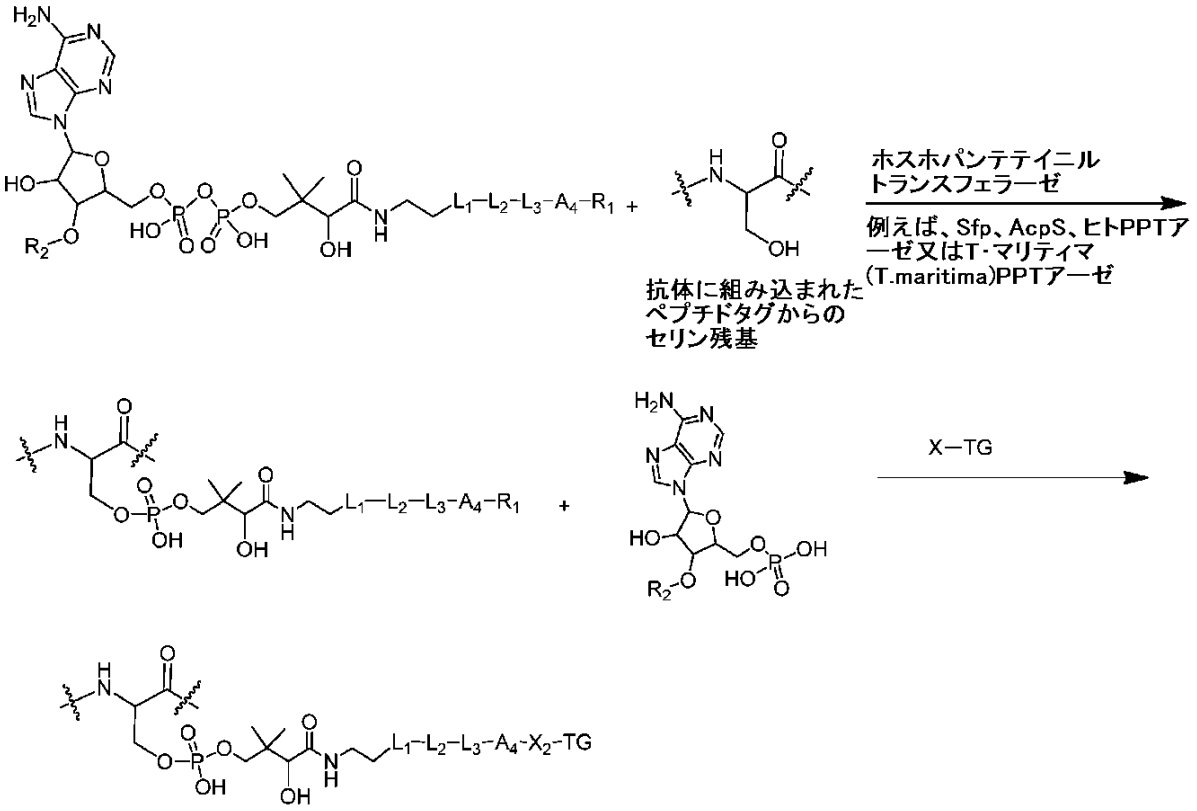
【０３９３】

２ステップ法の別の実施形態をスキーム（ＩＩｄ）に示す。

【０３９４】

【化１６８】

スキーム(IId)



［式中、Ｘ、Ｒ１、Ｒ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ａ４、Ｘ２、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０３９５】

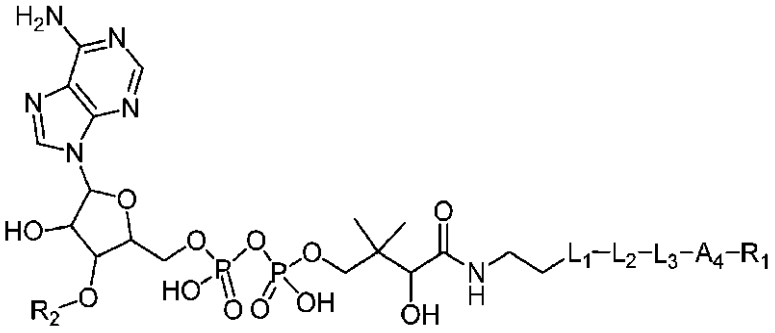
スキーム（ＩＩｄ）の２ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｇ）の化合物

【０３９６】

【化１６９】

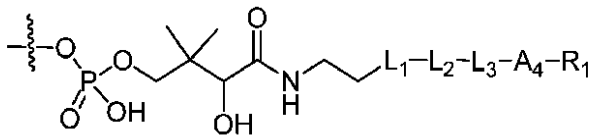


式(G)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｇ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル

【０３９７】

【化１７０】



式（Ｇ－ａ）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩ－ｇ）の化合物：

Ｘ－ＴＧ

式（ＩＩ－ｇ）

［式中、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

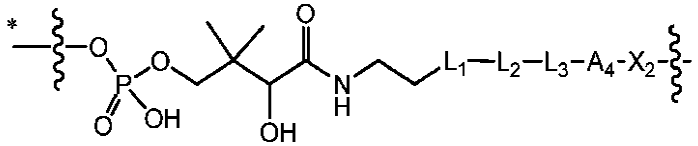
を含む。

【０３９８】

スキーム（ＩＩｄ）の２ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩ－ｈ）による構造を有するリンカー：

【０３９９】

【化１７１】



式（II－ｈ）

［式中、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ａ$_4$、およびＸ$_2$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

【０４００】

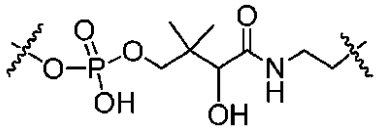
本明細書に記載の２ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、または式（Ｇ）の構造を有する化合物、および発現される修飾抗体またはその断片と同じ細胞内で同時発現される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。本明細書に記載の２ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、細胞培地中で、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、または式（Ｇ）の構造を有する化合物、および同じ細胞中または別の細胞中で産生される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。本明細書に記載の２ステップ法のある特定の実施形態では、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素を、固体支持体上に固定化する。ある特定の実施形態では、固体支持体は、任意選択により、ビーズまたはカラム上のポリマーからなる。

【０４０１】

表４に、本明細書に記載の２ステップ法および３ステップ法で使用される式（Ｄ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基および式（ＩＩ－ａ）の化合物、ならびに結果として生じる、修飾抗体またはその断片中に設置された修飾セリンのある特定の実施形態を示す。注：Ａ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ^3、Ｌ$_4$，Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、Ｒ$_7$、Ｒ$_8$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりであり、Ｙは、

【０４０２】

【化１７２】

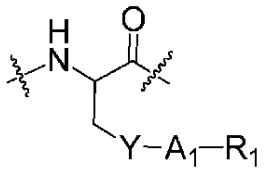
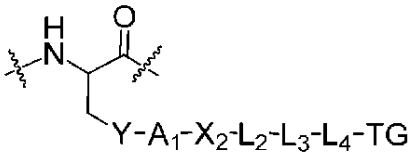
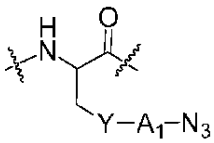
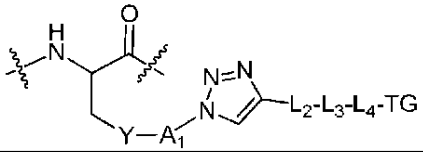
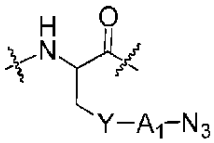
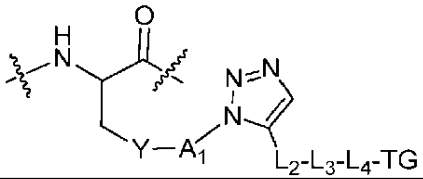
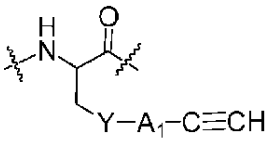
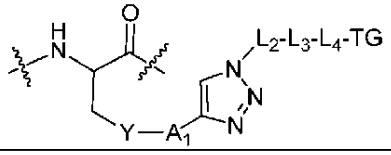


である。

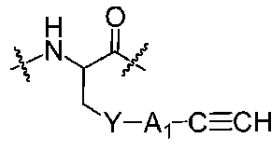
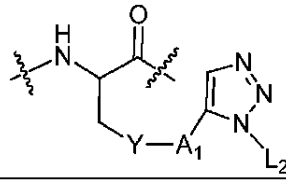
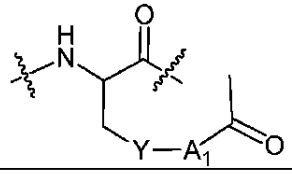
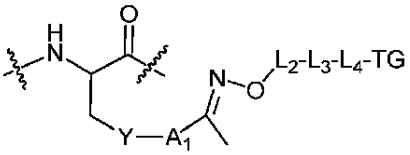
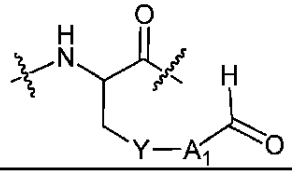
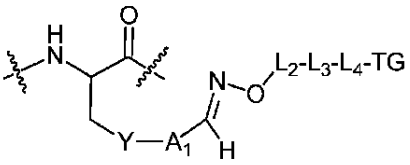
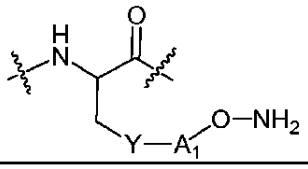
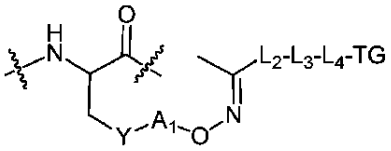
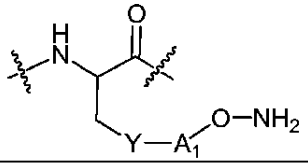
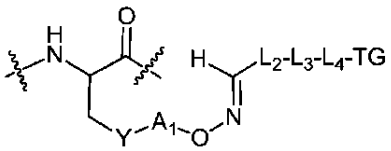
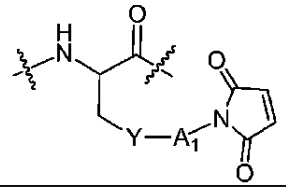
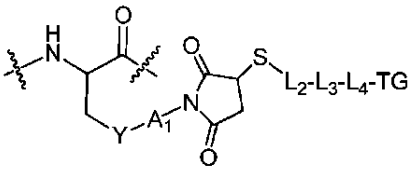
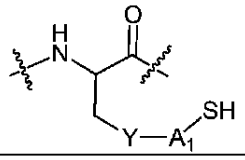
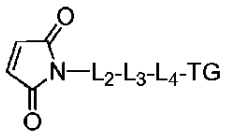
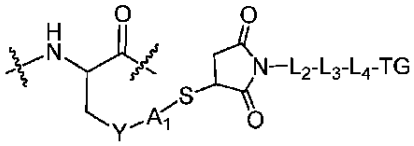
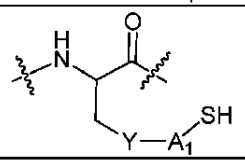
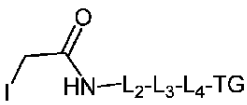
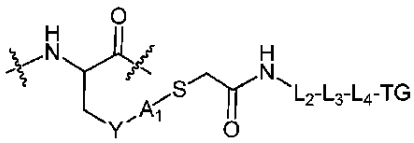
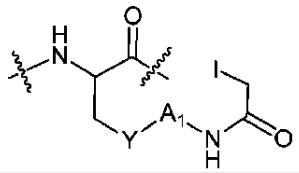
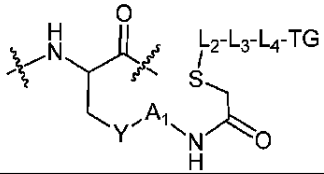
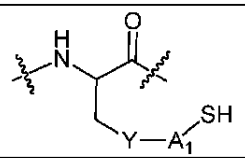
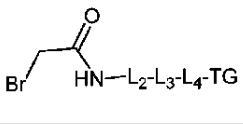
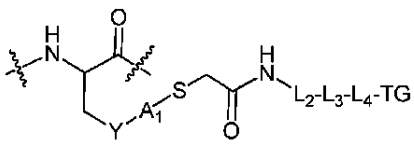
【０４０３】

【表４－１】

表4

	X-L_2-L_3-L_4-TG 式 (IIa)	
	HC≡C−L_2−L_3-L_4−TG	
	HC≡C−L_2−L_3-L_4−TG	
	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	

【表４－２】

	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_2-L_3-L_4-TG	
	$CH_3C(=O)$-L_2-L_3-L_4-TG	
	HC(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	HS-L_2-L_3-L_4-TG	
		
		
	HS—L_2-L_3-L_4-TG	
		

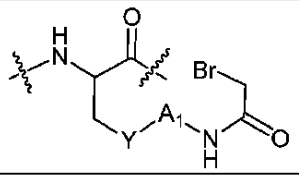
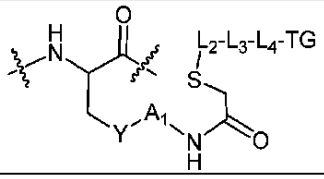
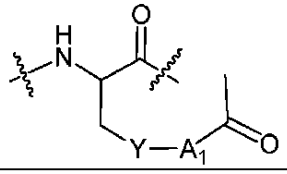
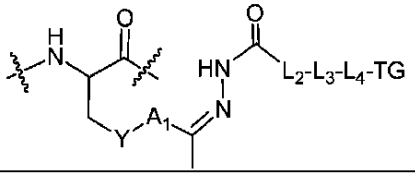
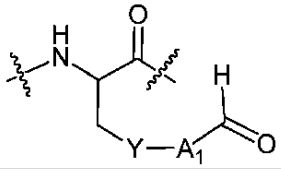
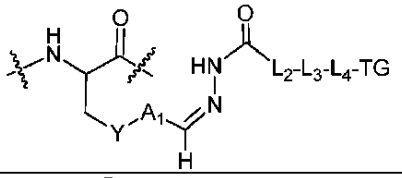
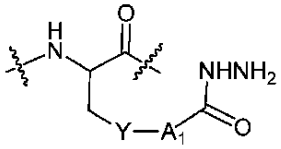
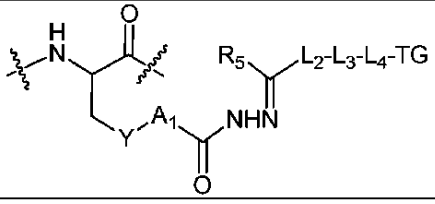
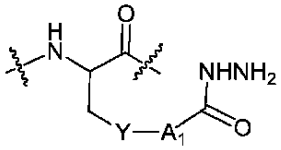
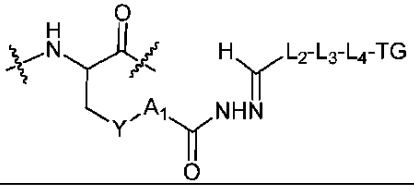
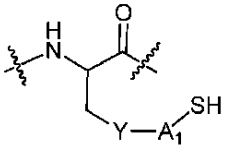
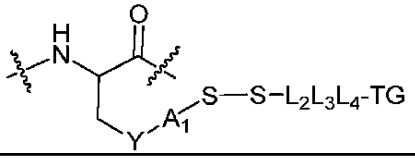
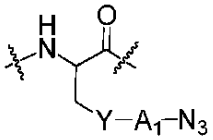
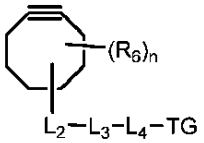
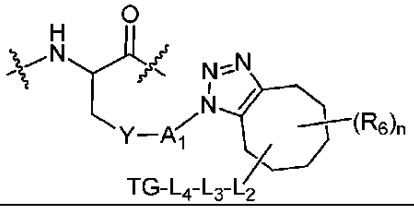
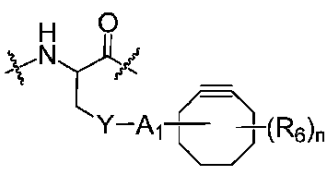
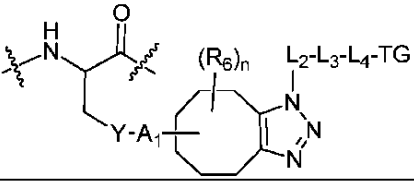
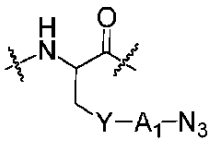
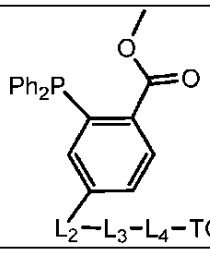
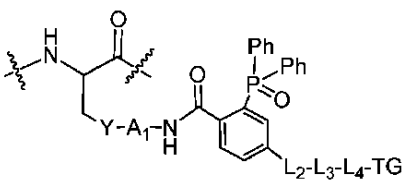
10

20

30

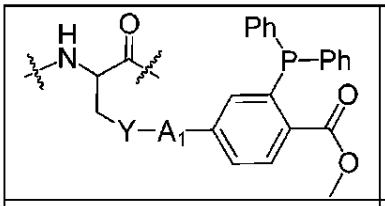
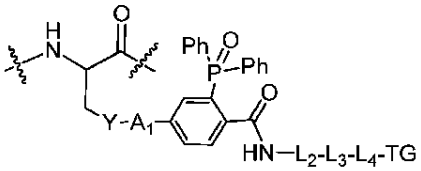
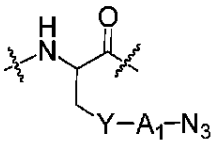
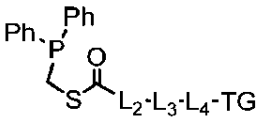
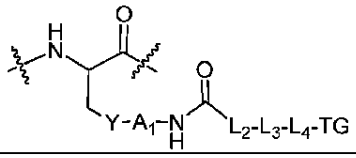
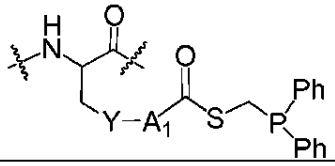
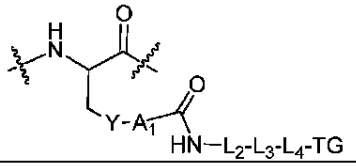
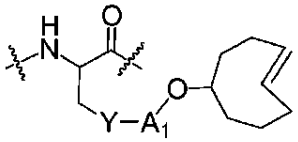
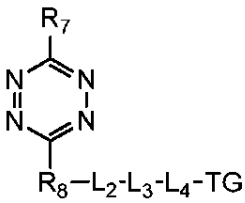
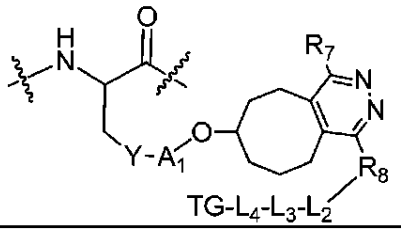
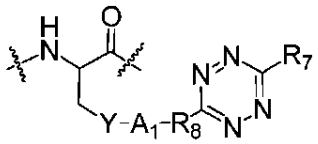
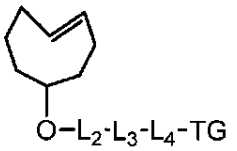
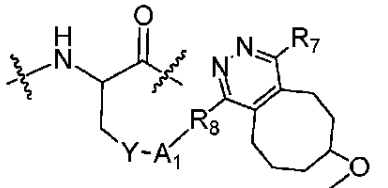
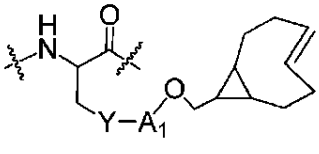
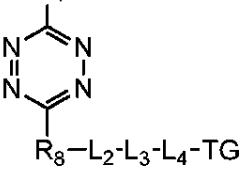
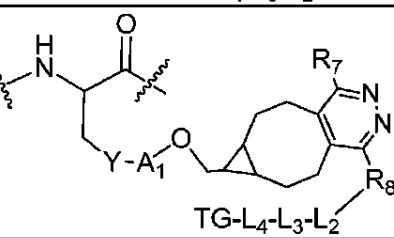
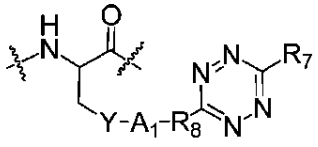
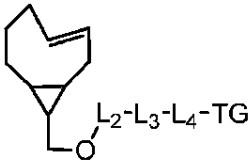
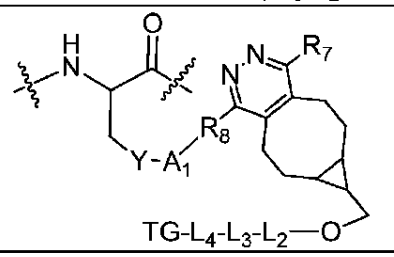
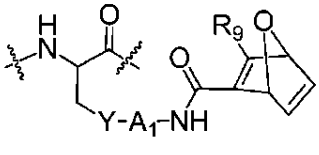
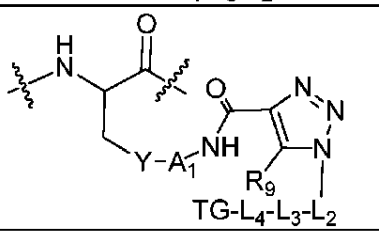
40

【表４－３】

	HS—L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	R_5C(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	HC(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	HS-L_2-L_3-L_4-TG	
		
		
		

10 20 30 40

【表４－４】

	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	
		
	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	
		
		
		
		
	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	

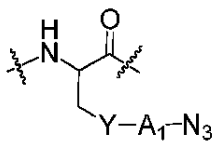
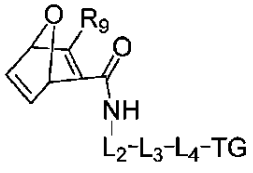
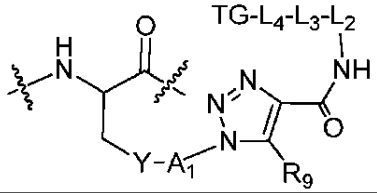
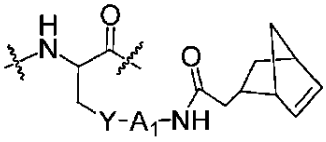
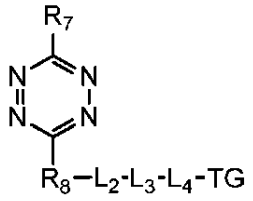
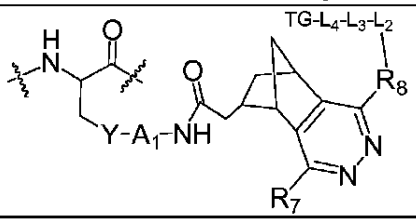
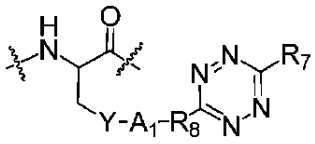
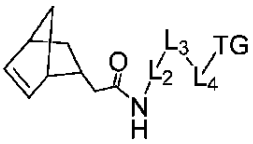
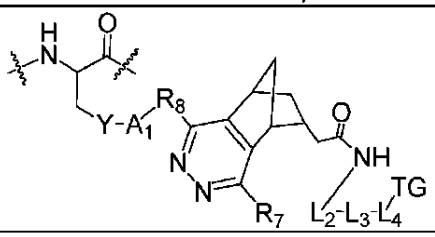
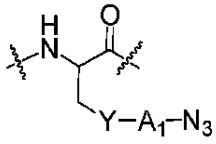
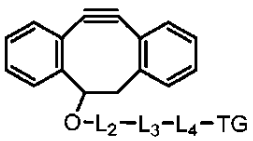
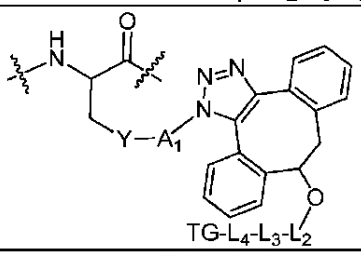
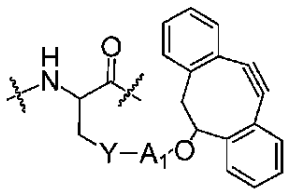
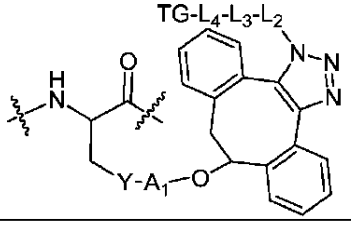
10

20

30

40

【表４－５】

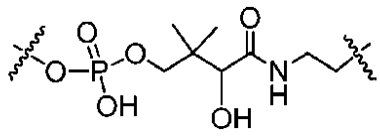
		
		
		
		
	N3-L2-L3-L4-TG	

【０４０４】

表５に、本明細書に記載の２ステップ法および３ステップ法で使用される式（Ｅ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基および式（ＩＩ－ｃ）の化合物、ならびに結果として生じる、修飾抗体またはその断片中に設置された修飾セリンのある特定の実施形態を示す。注：L_1、A_2、L_3、L_4，R_5、R_6、R_7、R_8、およびＴＧは本明細書において定義するとおりであり、Ｙは、

【０４０５】

【化１７３】

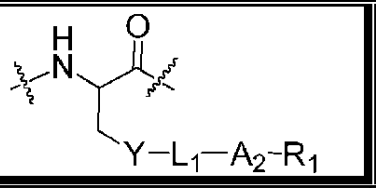
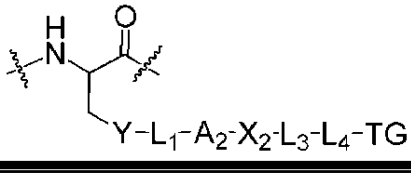
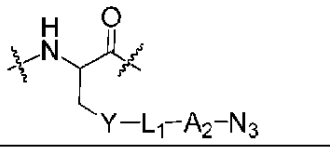
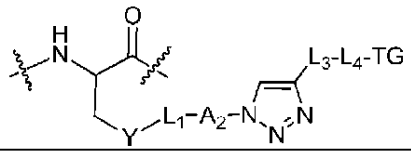
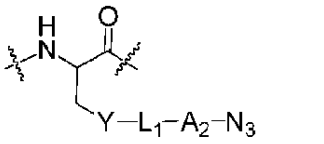
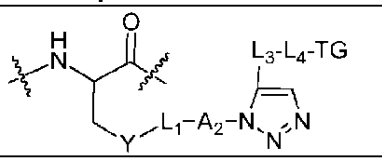
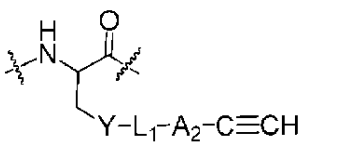
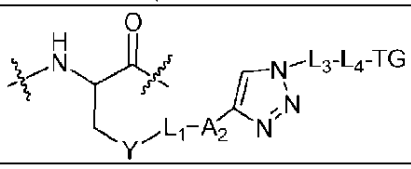
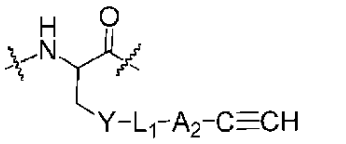
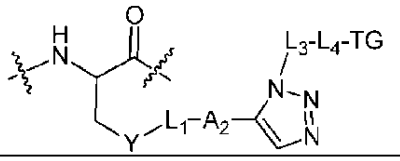
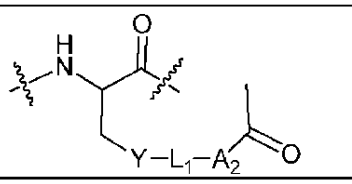
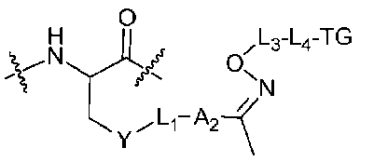
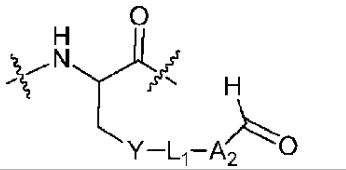
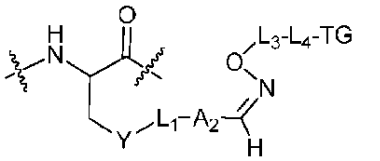
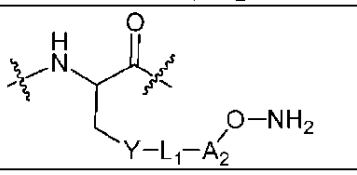
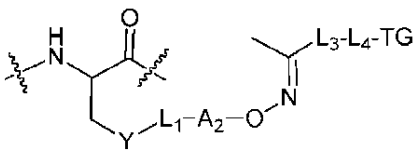
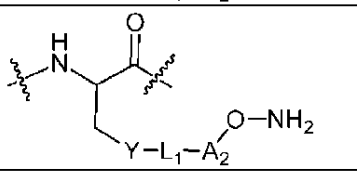
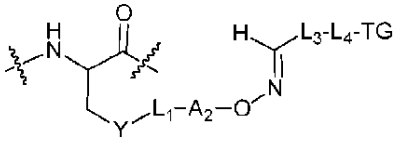
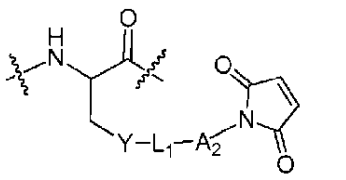
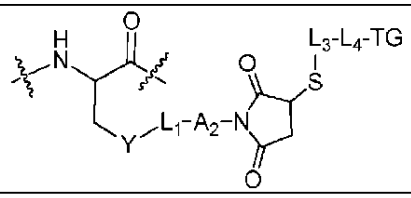


である。

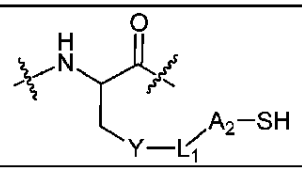
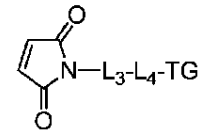
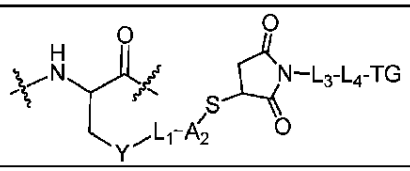
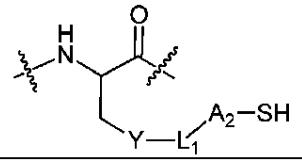
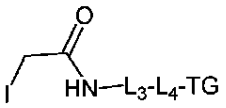
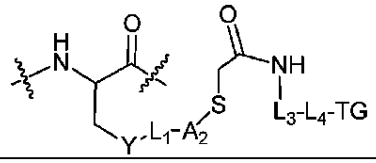
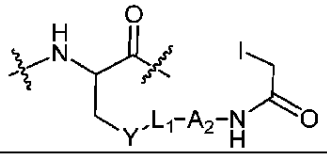
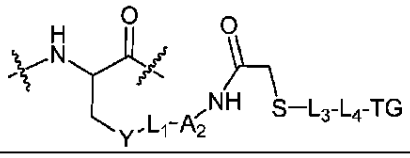
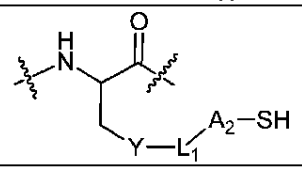
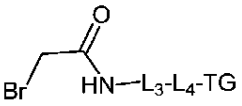
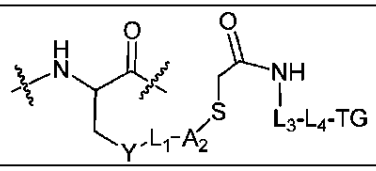
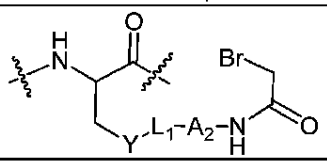
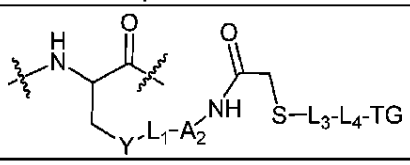
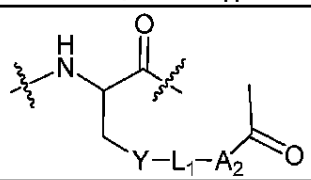
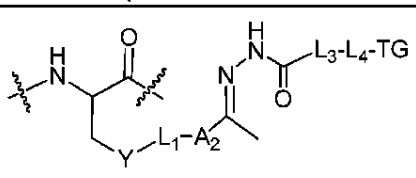
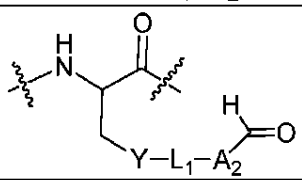
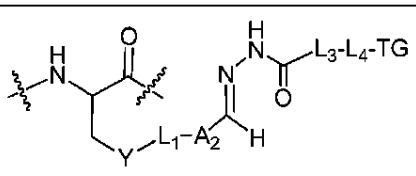
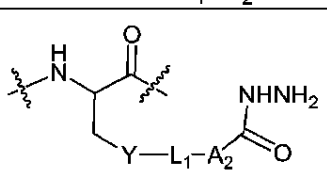
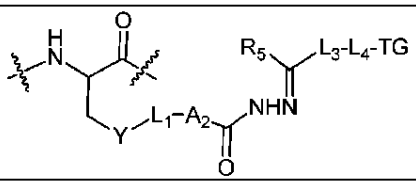
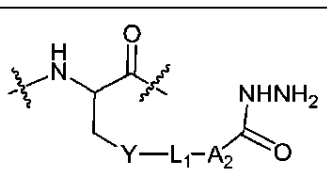
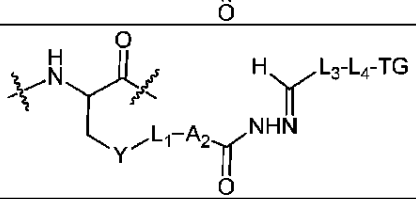
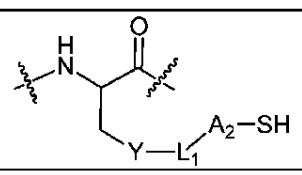
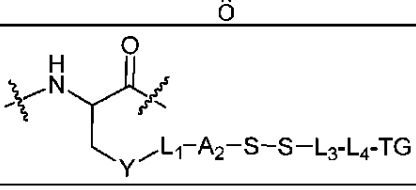
【０４０６】

【表５－１】

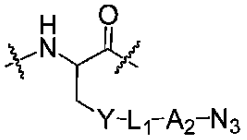
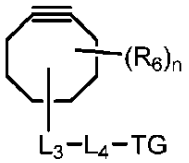
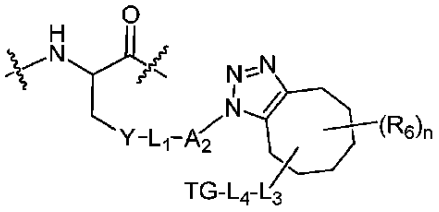
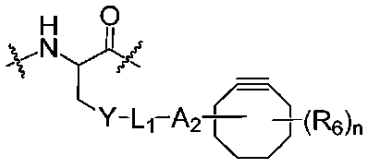
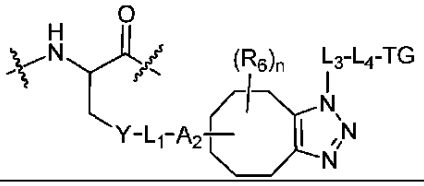
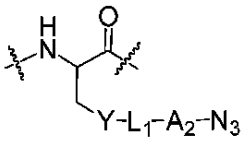
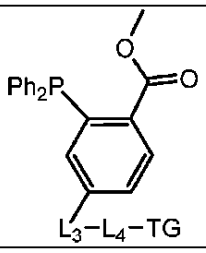
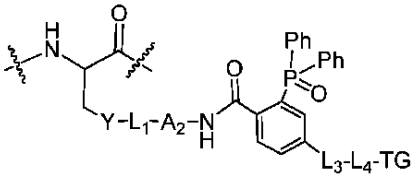
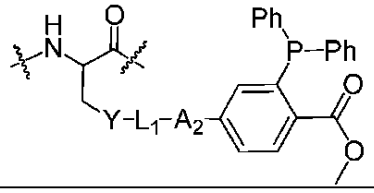
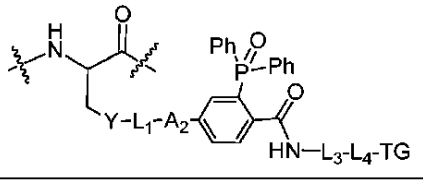
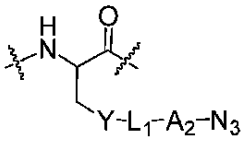
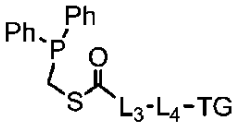
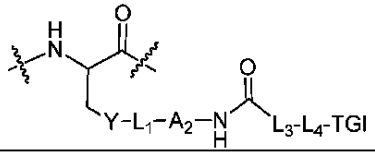
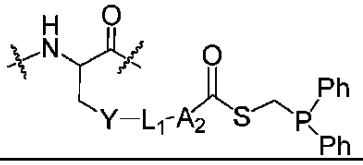
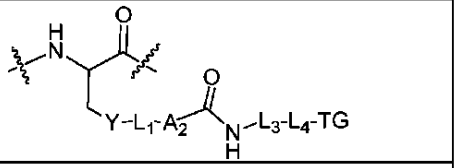
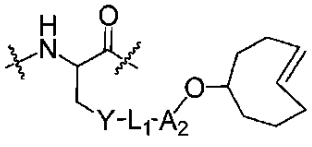
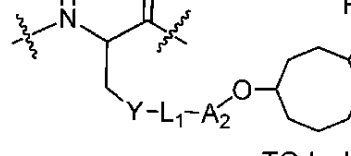
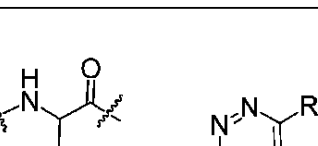
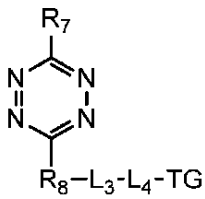
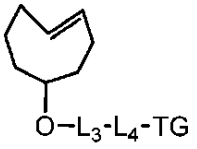
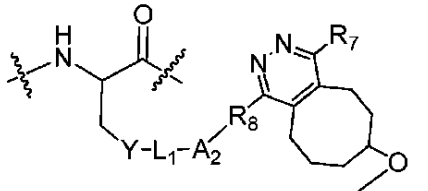
表5

	X-L_3-L_4-TG 式 (II-c)	
	HC≡C−L_3-L_4-TG	
	HC≡C−L_3-L_4-TG	
	N_3-L_3-L_4-TG	
	N_3-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_3-L_4-TG	
	$CH_3C(=O)$-L_3-L_4-TG	
	HC(=O)-L_3-L_4-TG	
	HS-L_3-L_4-TG	

【表５－２】

		
		
	$HS-L_3-L_4-TG$	
		
	$HS-L_3-L_4-TG$	
	$NH_2-NH-C(=O)-L_3-L_4-TG$	
	$NH_2-NH-C(=O)-L_3-L_4-TG$	
	$R_5C(=O)-L_3-L_4-TG$	
	$HC(=O)-L_3-L_4-TG$	
	$SH-L_3-L_4-TG$	

【表５－３】

		
	N_3-L_3-L_4-TG	
		
	N_3-L_3-L_4-TG	
		
	N_3-L_3-L_4-TG	
	N_3-L_3-L_4-TG	
		
		

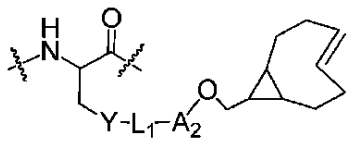
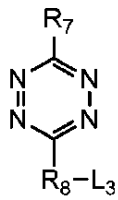
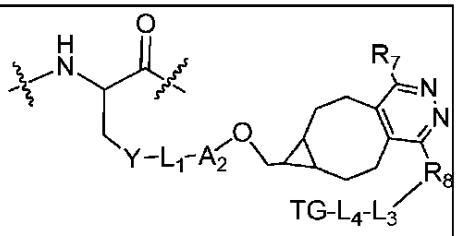
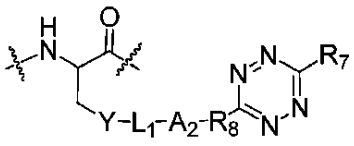
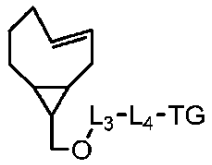
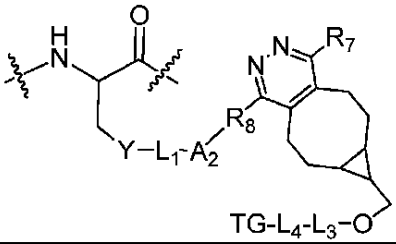
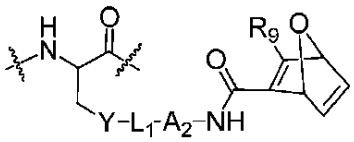
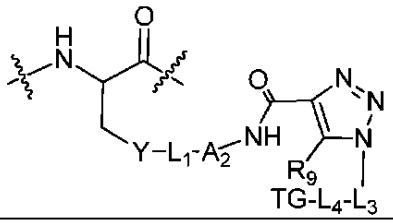
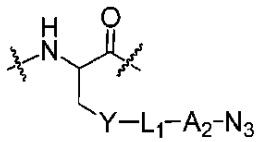
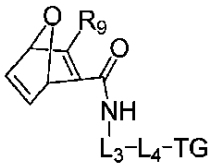
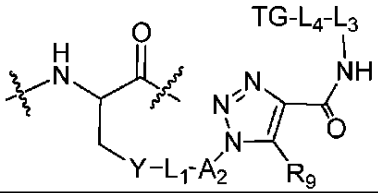
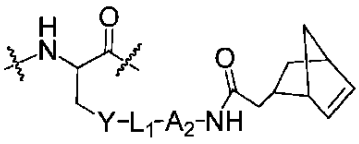
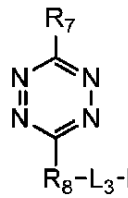
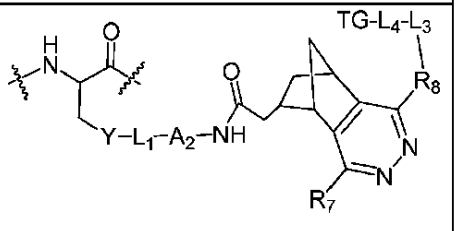
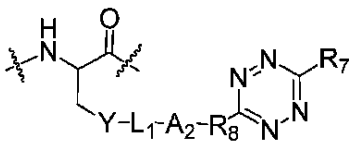
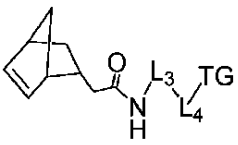
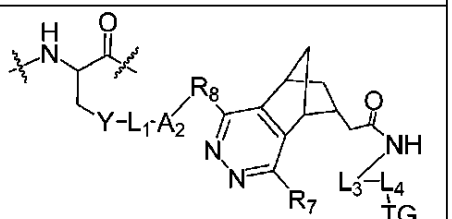
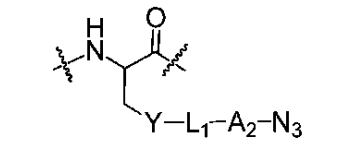
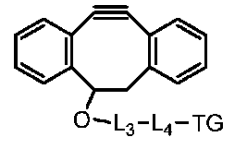
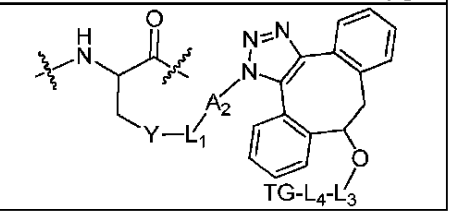
10

20

30

40

【表５－４】

		
		
	N_3-L_3-L_4-TG	
		
		
		
		

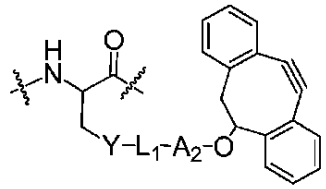
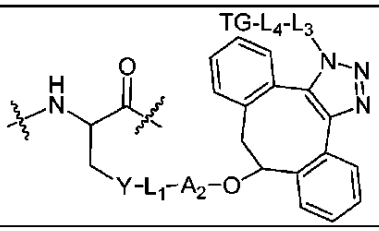
10

20

30

40

【表５－５】

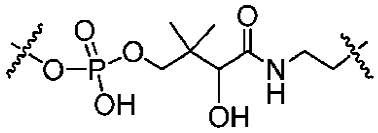
	N_3-L_3-L_4-TG	

【０４０７】

表６に、本明細書に記載の２ステップ法および３ステップ法で使用される式（Ｆ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基および式（ＩＩ－ｅ）の化合物、ならびに結果として生じる、修飾抗体またはその断片中に設置された修飾セリンのある特定の実施形態を示す。注：L_1、L_2、A_3、L_4，R_5、R_6、R_7、R_8、およびＴＧは本明細書において定義するとおりであり、Ｙは、

【０４０８】

【化１７４】

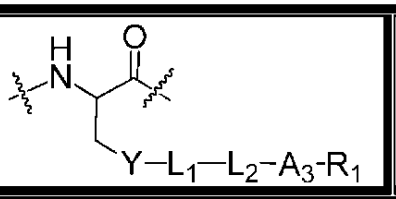
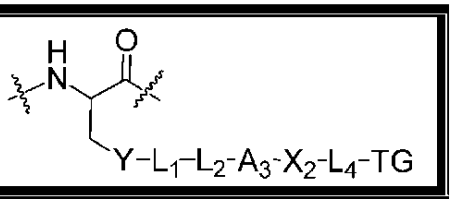
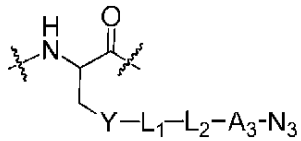
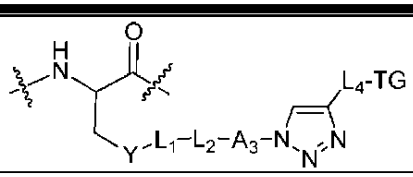
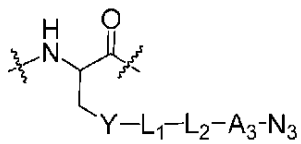
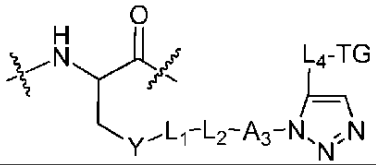
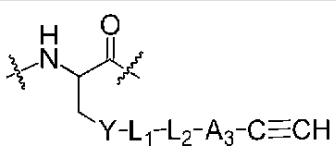
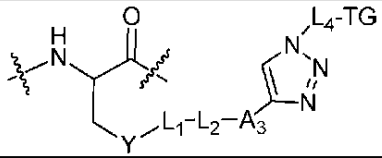
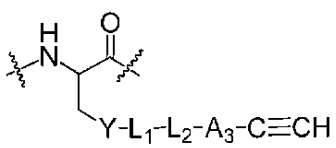
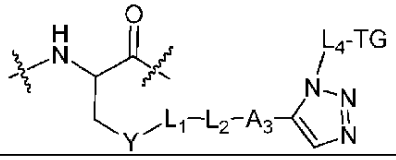


である。

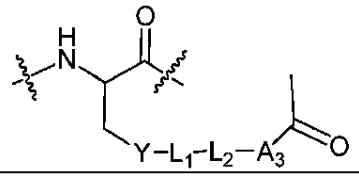
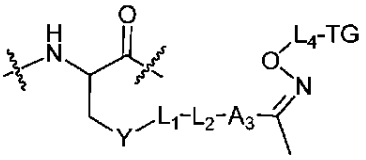
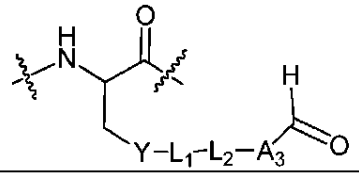
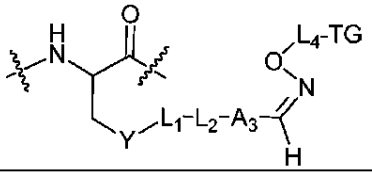
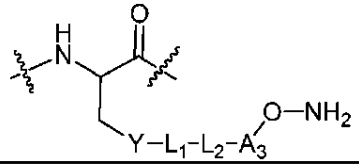
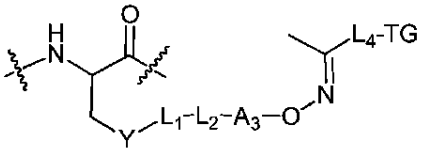
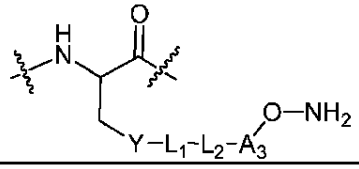
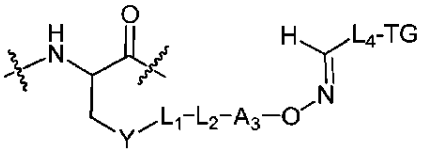
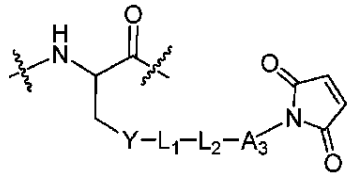
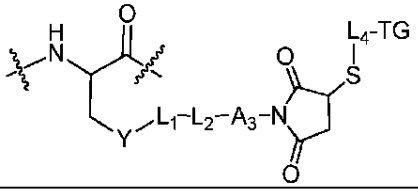
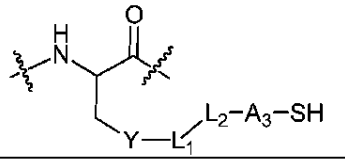
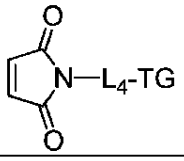
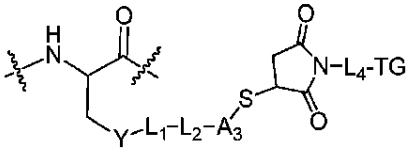
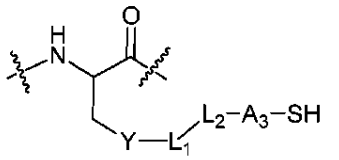
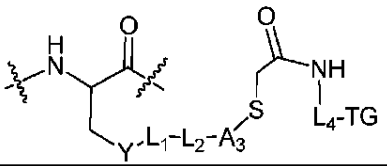
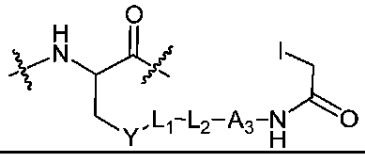
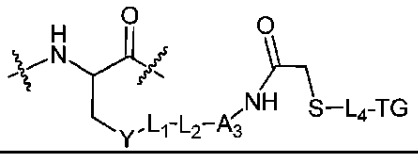
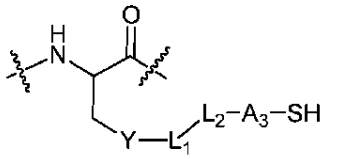
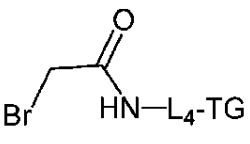
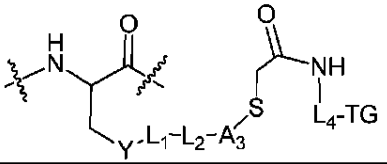
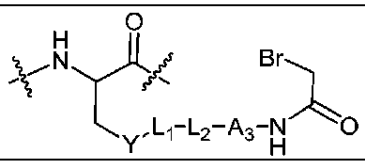
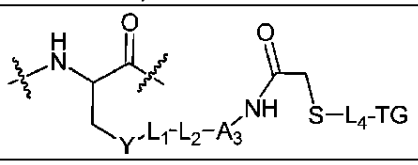
【０４０９】

【表６－１】

表6

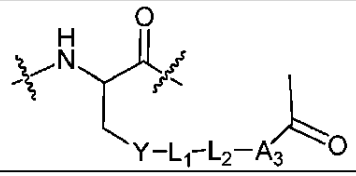
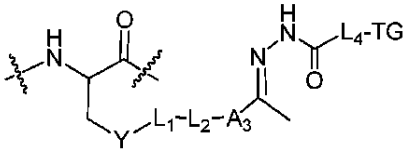
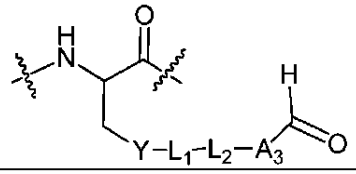
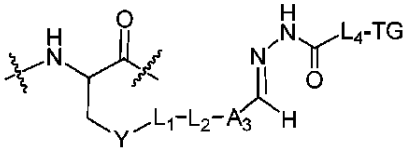
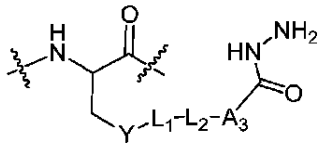
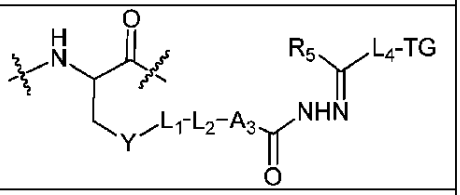
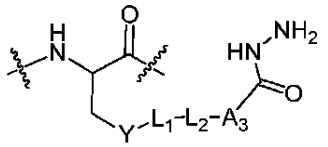
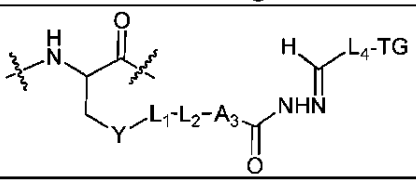
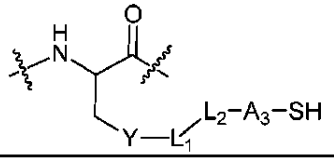
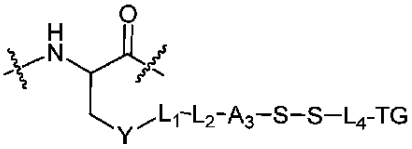
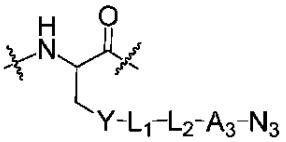
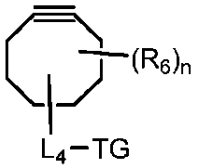
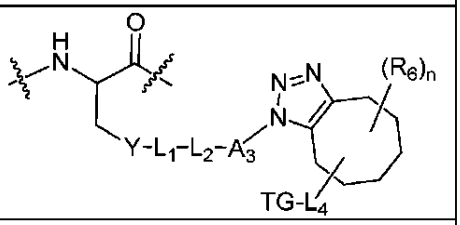
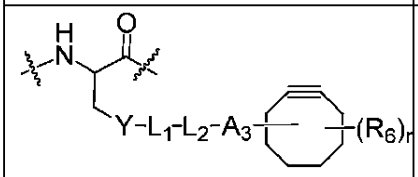
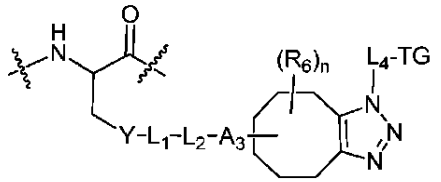
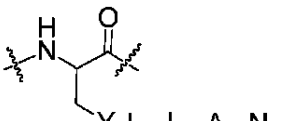
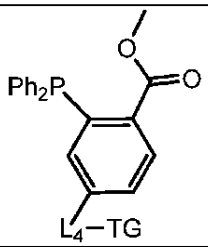
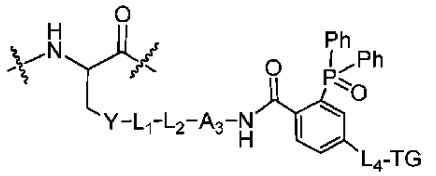
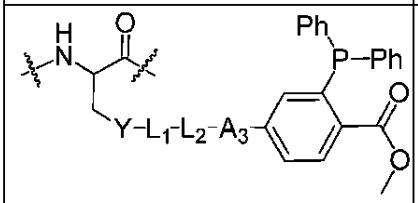
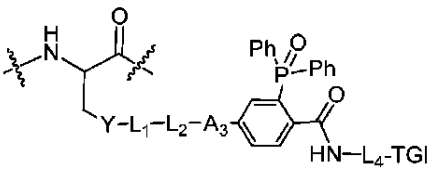
	X-L_4-TG 式(II-e)	
	HC≡C－L_4－TG	
	HC≡C－L_4－TG	
	N_3-L_4-TG	
	N_3-L_4-TG	

【表６－２】

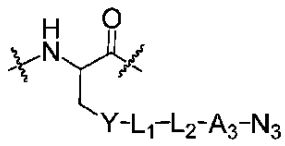
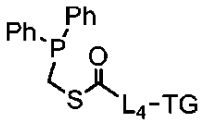
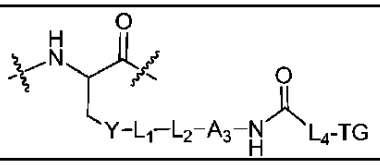
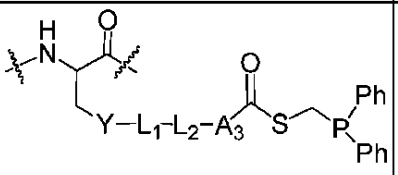
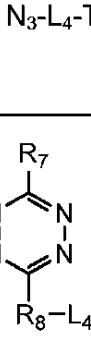
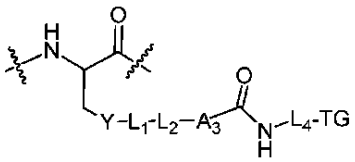
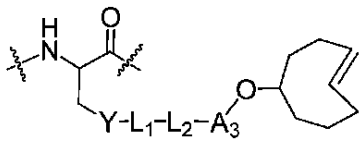
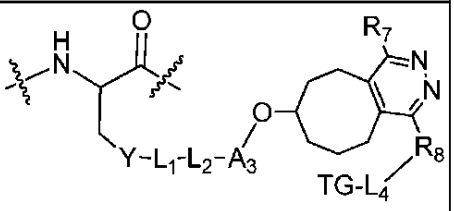
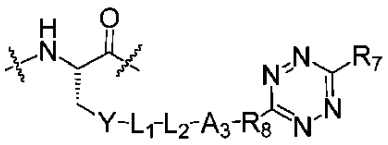
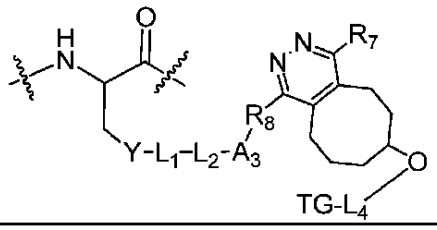
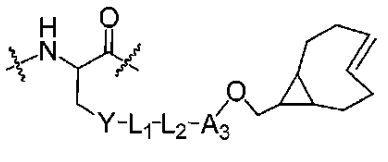
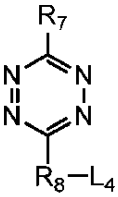
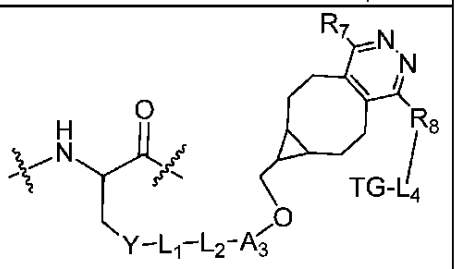
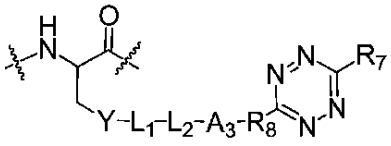
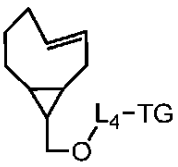
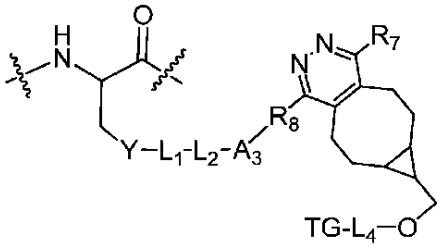
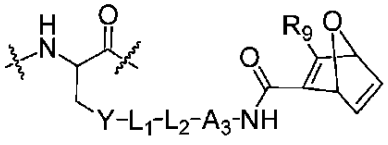
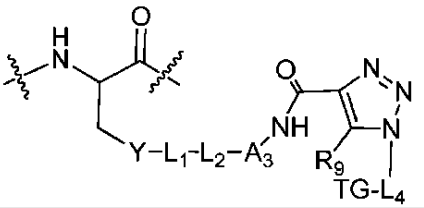
	NH_2-O-L_4-TG	
	NH_2-O-L_4-TG	
	$CH_3C(=O)$-L_4-TG	
	HC(=O)-L_4-TG	
	HS-L_4-TG	
		
		
	HS—L_4-TG	
		
	HS—L_4-TG	

10 20 30 40

【表６－３】

	NH_2-NH-C(=O)-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_4-TGI	
	$R_5C(=O)$-L_4-TG	
	HC(=O)-L_4-TG	
	HS-L_4-TG	
		
	N_3-L_4-TG	
		
	N_3-L_4-TG	

【表６－４】

		
		
		
		
		
		
	N3-L4-TG	

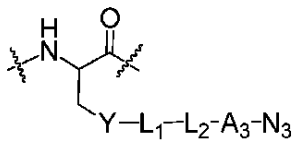
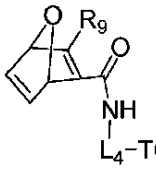
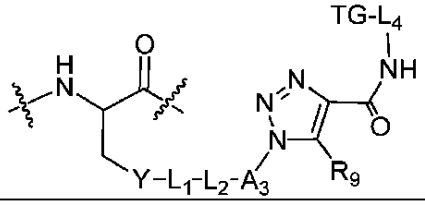
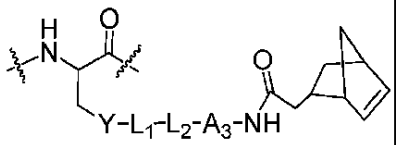
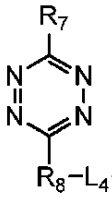
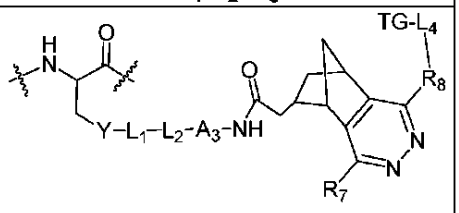
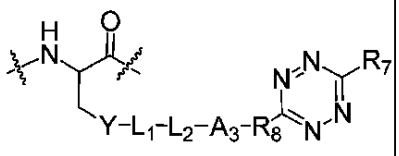
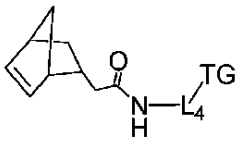
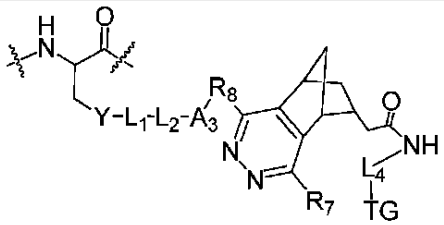
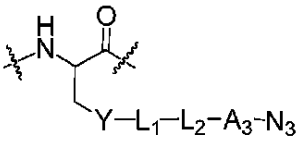
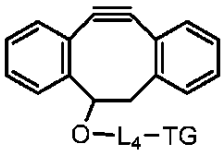
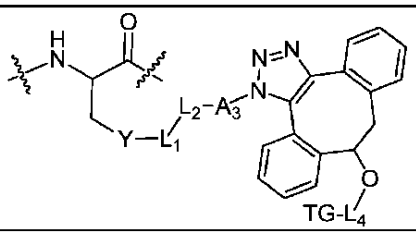
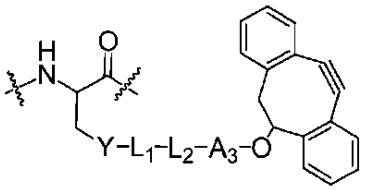
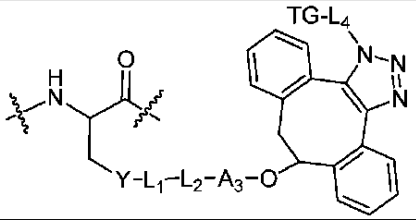
10

20

30

40

【表６－５】

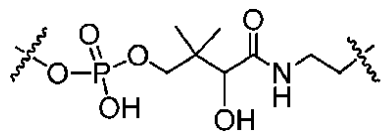
		
		
		
		
	N_3-L_4-TG	

【０４１０】

表７に、本明細書に記載の２ステップ法および３ステップ法で使用される式（Ｇ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基および式（ＩＩ－ｇ）の化合物、ならびに結果として生じる、修飾抗体またはその断片中に設置された修飾セリンのある特定の実施形態を示す。注：L_1、L_2、L_3、A_4、R_5、R_6、R_7、R_8、およびＴＧは本明細書において定義するとおりであり、Ｙは、

【０４１１】

【化１７５】

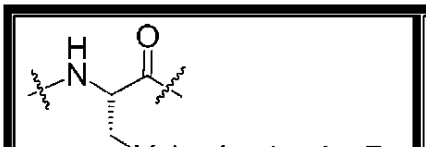
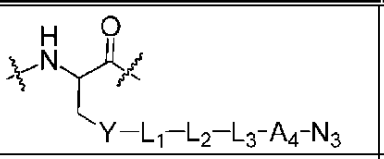
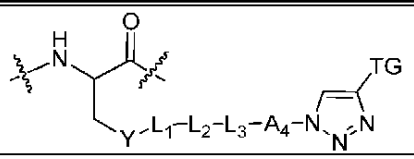
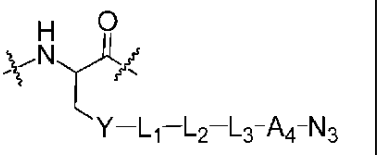
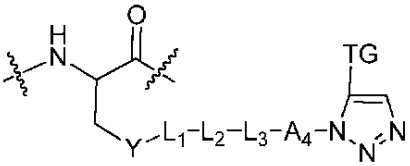
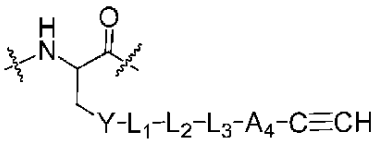
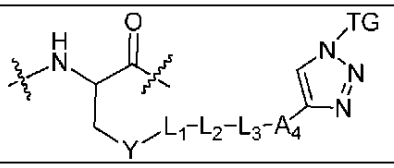
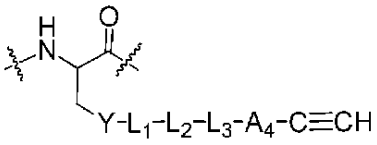
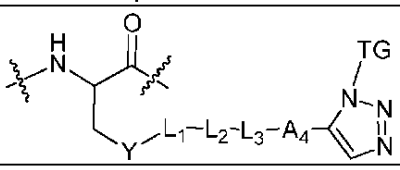
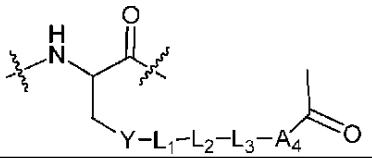
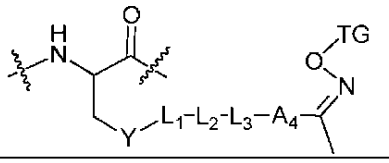
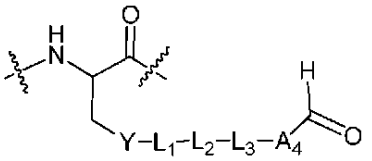
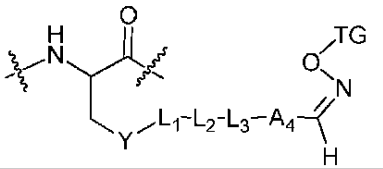
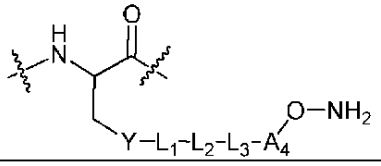
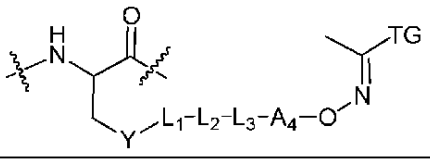
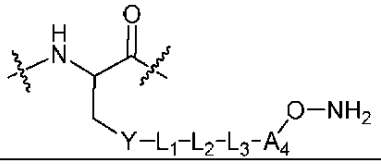
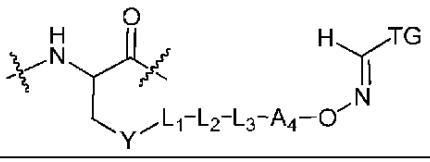
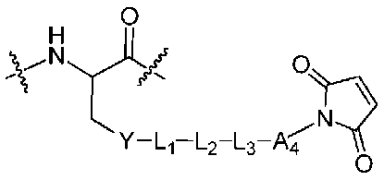
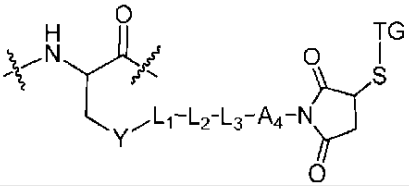


である。

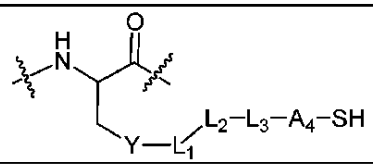
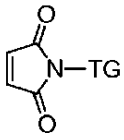
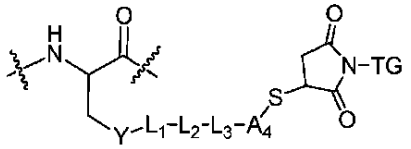
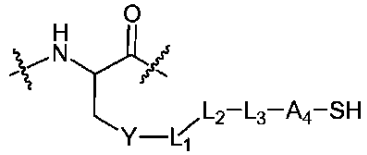
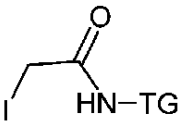
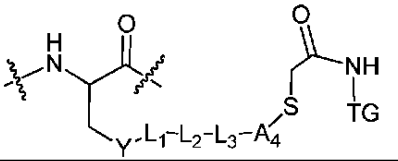
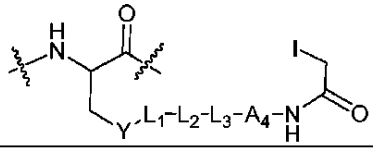
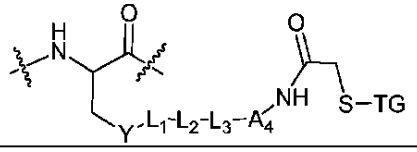
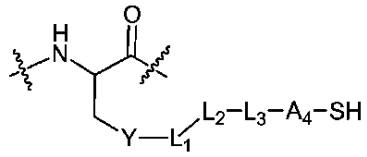
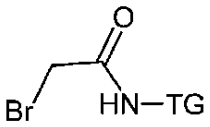
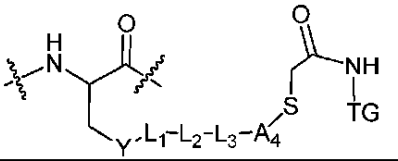
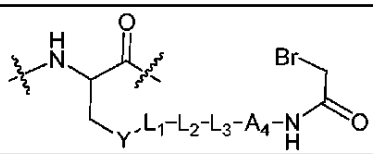
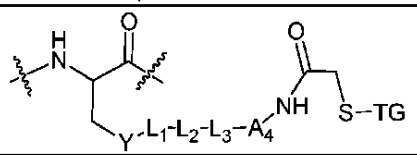
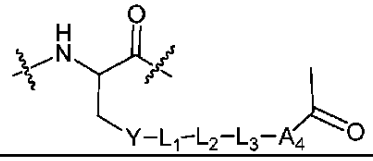
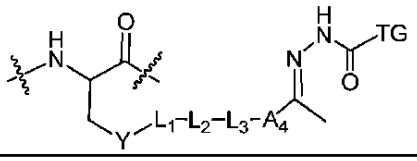
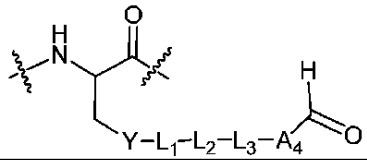
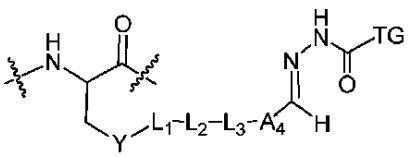
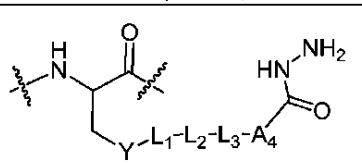
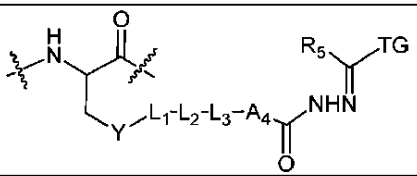
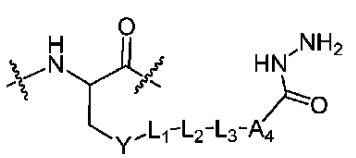
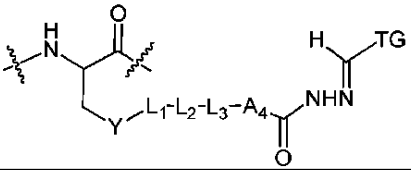
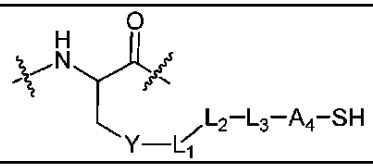
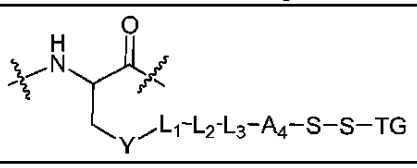
【０４１２】

【表７－１】

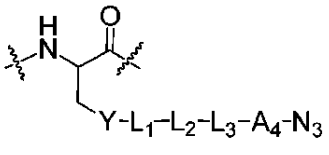
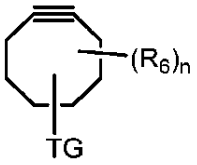
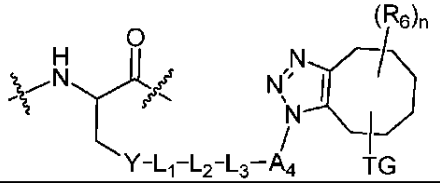
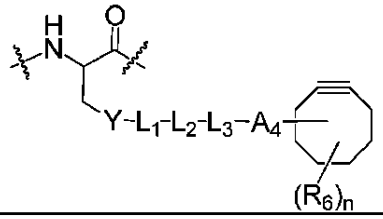
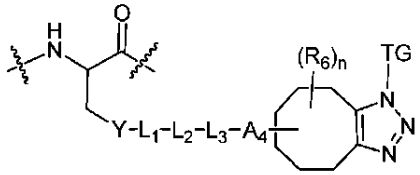
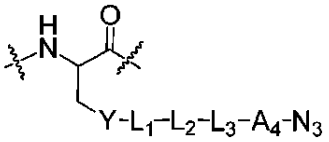
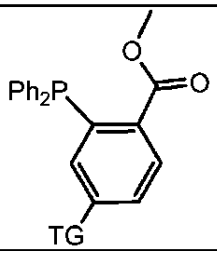
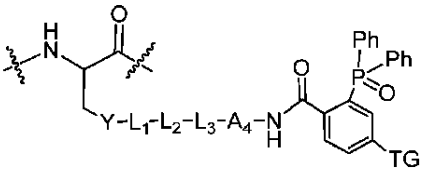
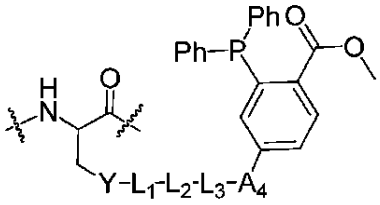
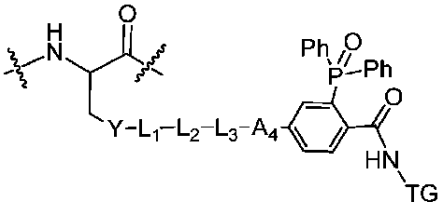
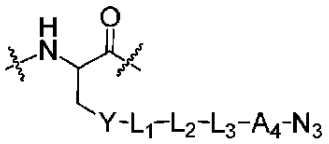
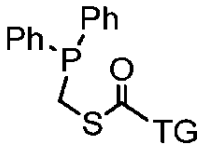
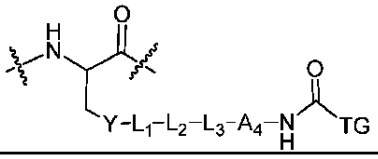
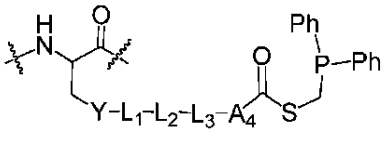
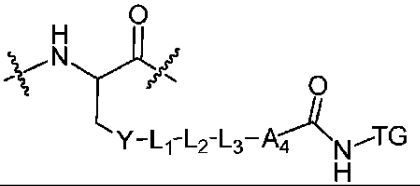
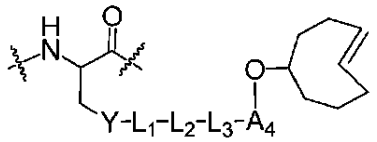
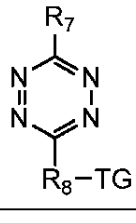
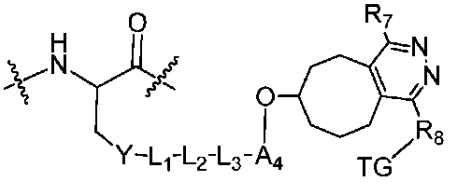
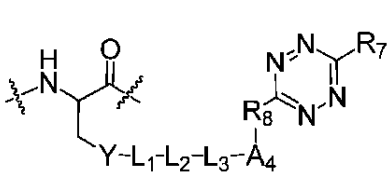
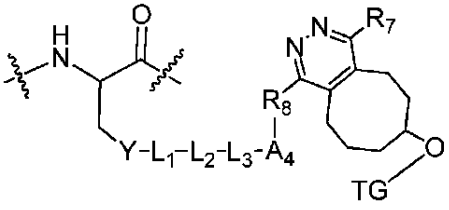
表7

	X-TG 式 (II-g)	
	HC≡C−TG	
	HC≡C−TG	
	N_3-TG	
	N_3-TG	
	NH_2-O-TG	
	NH_2-O-TG	
	$CH_3C(=O)$-TG	
	HC(=O)-TG	
	HS-TG	

【表７－２】

		
		
	HS—TG	
		
	HS—TG	
	NH_2-NH-C(=O)-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-TG	
	$R_5C(=O)$-TG	
	HC(=O)-TG	
	HS-TG	

【表７－３】

		
	N_3-TG	
		
	N_3-TG	
		
	N_3-TG	
		
		

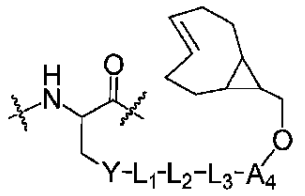
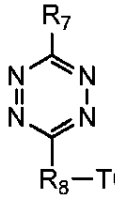
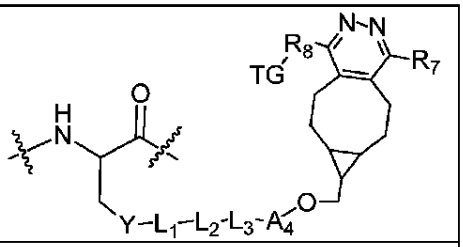
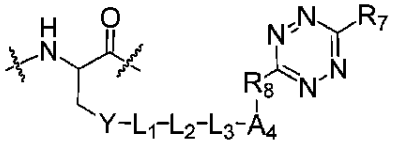
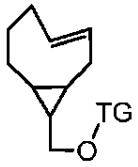
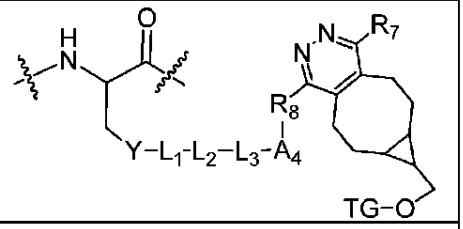
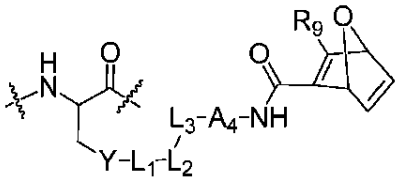
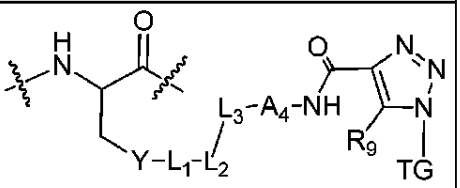
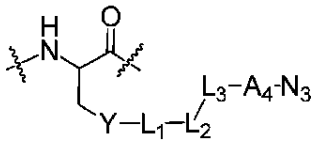
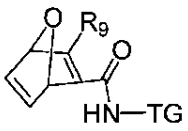
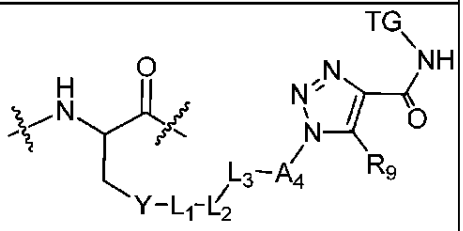
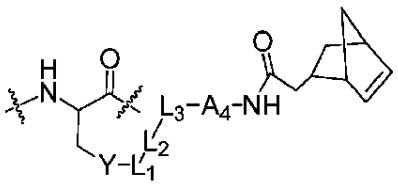
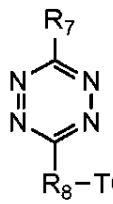
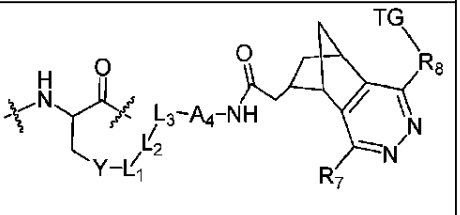
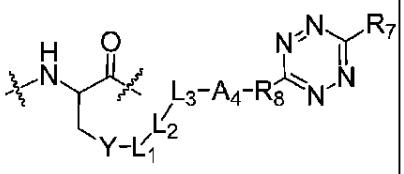
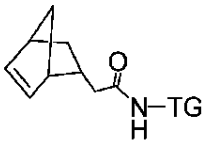
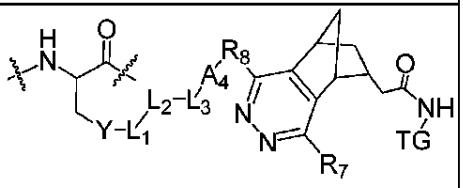
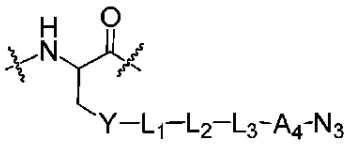
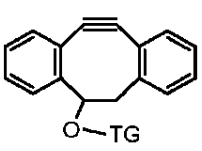
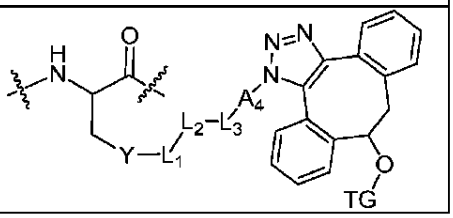
10

20

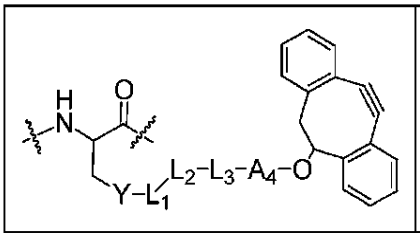
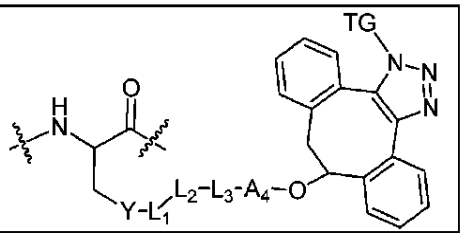
30

40

【表７－４】

		
		
	N_3-TG	
		
		
		
		

【表７－５】

	N_3-TG	

【０４１３】

３ステップ法

別法では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、３ステップ法によって部位特異的に標識し、この際、第１のステップでは、ＣｏＡの保護ｐｐａｎ補欠分子族またはＣｏＡ類似体の保護修飾ｐｐａｎ補欠分子族を、４’－ホスホパンテテイニル部分と、抗体に組み込まれている短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基との間に形成されるホスホジエステル結合によって、短いペプチドタグに結合させる。第２のステップでは、ＣｏＡの保護ｐｐａｎ補欠分子族またはＣｏＡ類似体の保護修飾ｐｐａｎ補欠分子族を脱保護し、それによって反応性官能基（R_1）を生成する。第３のステップでは、官能基（R_1）と反応性である基に連結しているか、または直接結合している末端基（ＴＧ）を、ＣｏＡのｐｐａｎ補欠分子族またはＣｏＡ類似体の修飾ｐｐａｎ補欠分子族上の官能基（R_1）と反応させ、それによって、末端基を修飾抗体またはその断片に直接結合させるか、末端基を修飾抗体またはその断片にリンカーユニット（ＬＵ）を介して結合させる。

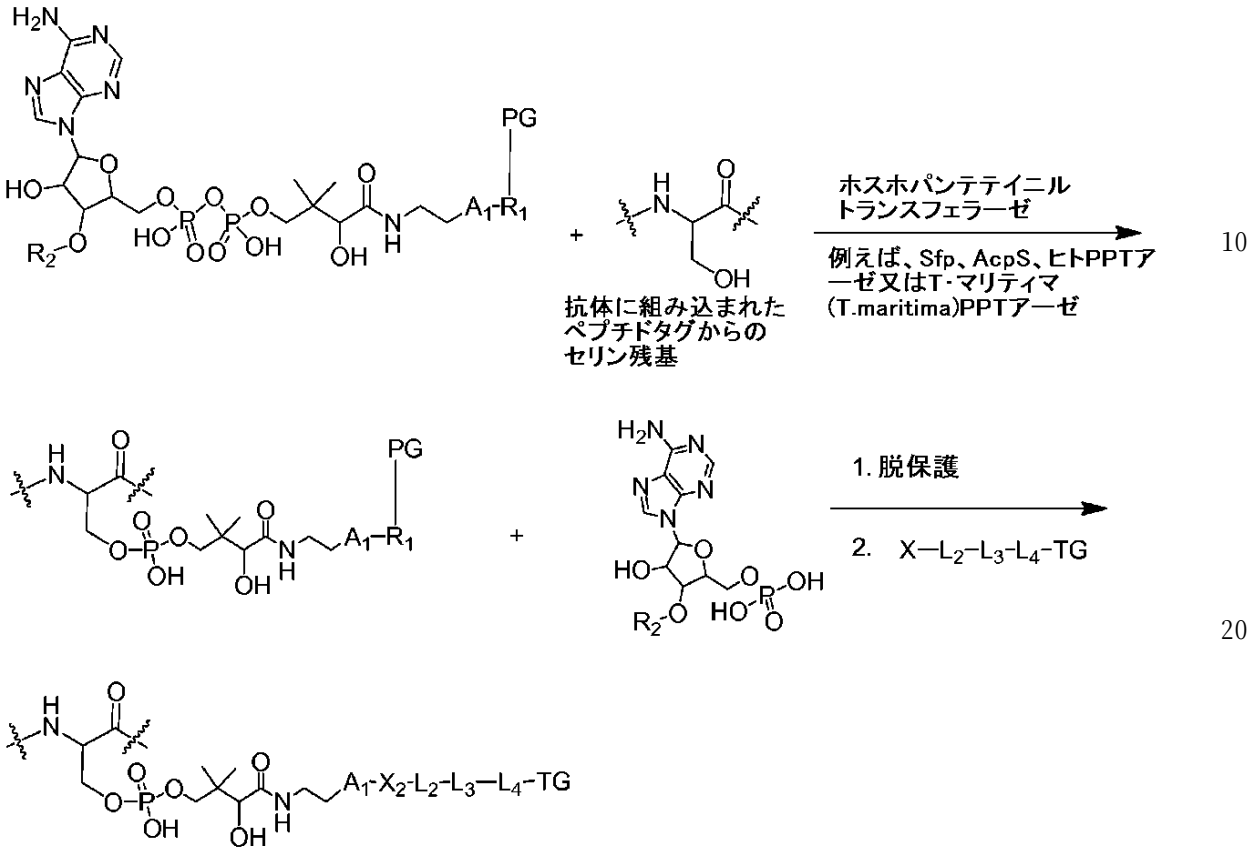
【０４１４】

３ステップ法の一実施形態をスキーム（ＩＩＩａ）に示す。

【０４１５】

【化１７６】

スキーム(IIIa)



［式中、Ｘおよび対応するＲ１は、表３において示したとおりであり、ＰＧは保護基であり、Ｒ２、Ａ１、Ｌ２、Ｘ２、Ｌ３、Ｌ４、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０４１６】

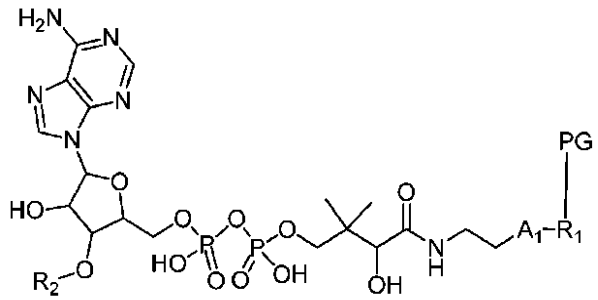
スキーム（ＩＩＩａ）の３ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式Ｈの化合物

【０４１７】

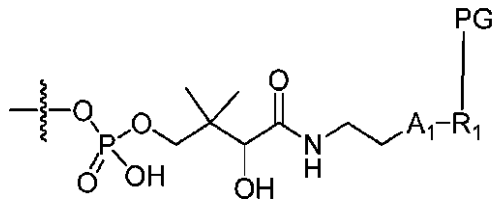
【化１７７】



式Ｈ

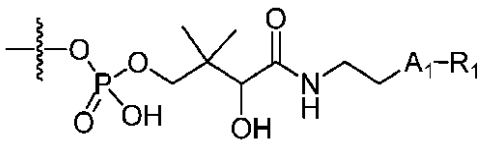
が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｈ－ａ）の保護４’－ホスホパンテテイニル基

【０４１８】
【化１７８】



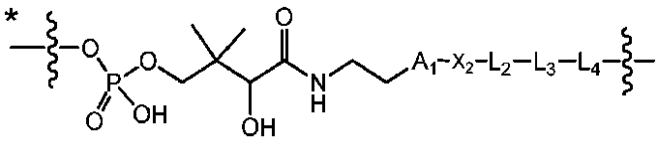
式（Ｈ－ａ）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、
（ｃ）保護４’－ホスホパンテテイニル基を脱保護して、式（Ｄ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基：
【０４１９】
【化１７９】



式（Ｄ－ａ）

を得るステップと
（ｄ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩａ）の化合物：
　Ｘ－Ｌ$_2$－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－ＴＧ
　式（ＩＩａ）
［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ａ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］
と反応させるステップと
を含む。
【０４２０】
スキーム（ＩＩＩａ）の３ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩｂ）による構造を有するリンカー：
【０４２１】
【化１８０】

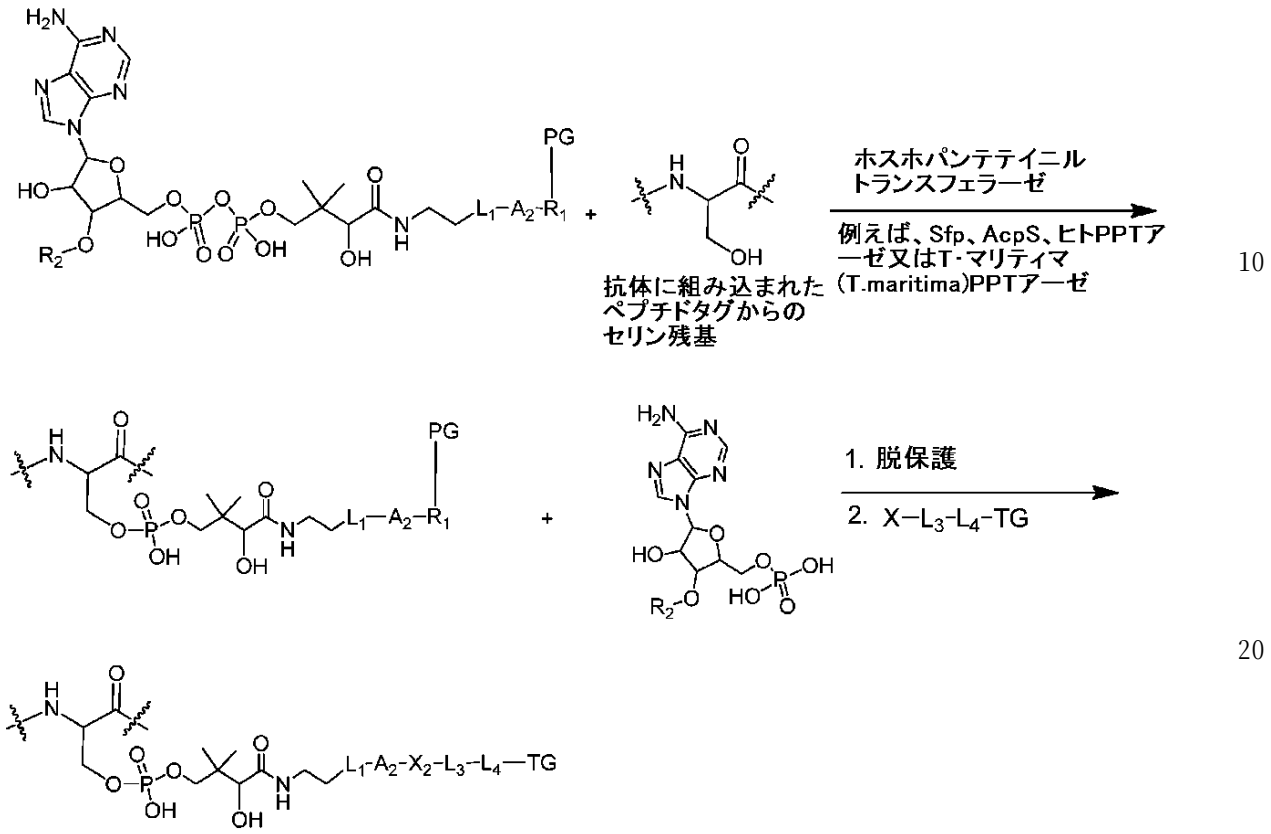


式（IIb）

［式中、Ａ$_1$、Ｘ$_2$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、およびＬ$_4$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。
【０４２２】
３ステップ法の別の実施形態をスキーム（ＩＩＩｂ）に示す。
【０４２３】

【化１８１】

スキーム(IIIb)



［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ１、Ｒ２、Ｌ１、Ａ２、Ｘ２、Ｌ３、Ｌ４、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０４２４】

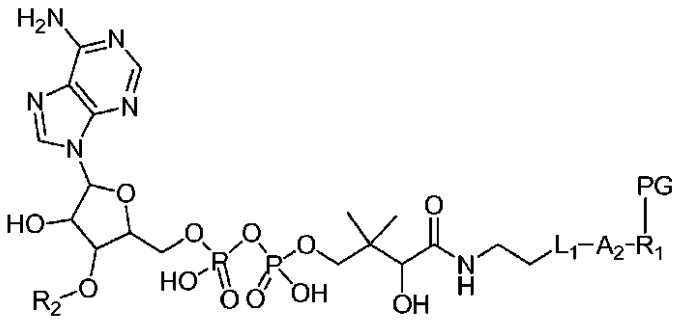
スキーム（ＩＩＩｂ）の３ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｊ）の化合物

【０４２５】

【化１８２】

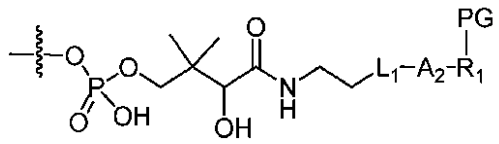


式(J)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｉ－ａ）の保護４’－ホスホパンテテイニル基

【０４２６】

【化１８３】



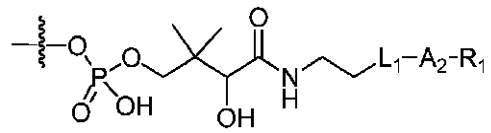
式（Ｊ－ａ）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）保護４’－ホスホパンテテイニル基を脱保護して、式（Ｅ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基：

【０４２７】

【化１８４】



式（Ｅ－ａ）

を得るステップと

（ｄ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩ－ｃ）の化合物：

Ｘ－Ｌ$_3$－Ｌ$_4$－ＴＧ

式（ＩＩ－ｃ）

［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｌ$_1$、Ａ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

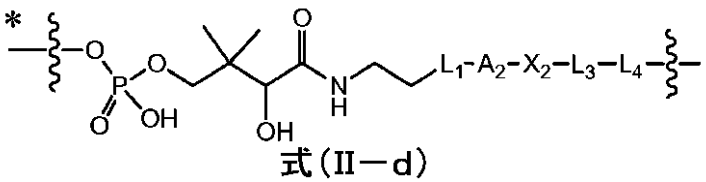
を含む。

【０４２８】

スキーム（ＩＩＩｂ）の３ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩ－ｄ）による構造を有するリンカー：

【０４２９】

【化１８５】



式（II－ｄ）

［式中、Ｌ$_1$、Ａ$_2$、Ｘ$_2$、Ｌ$_3$、およびＬ$_4$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

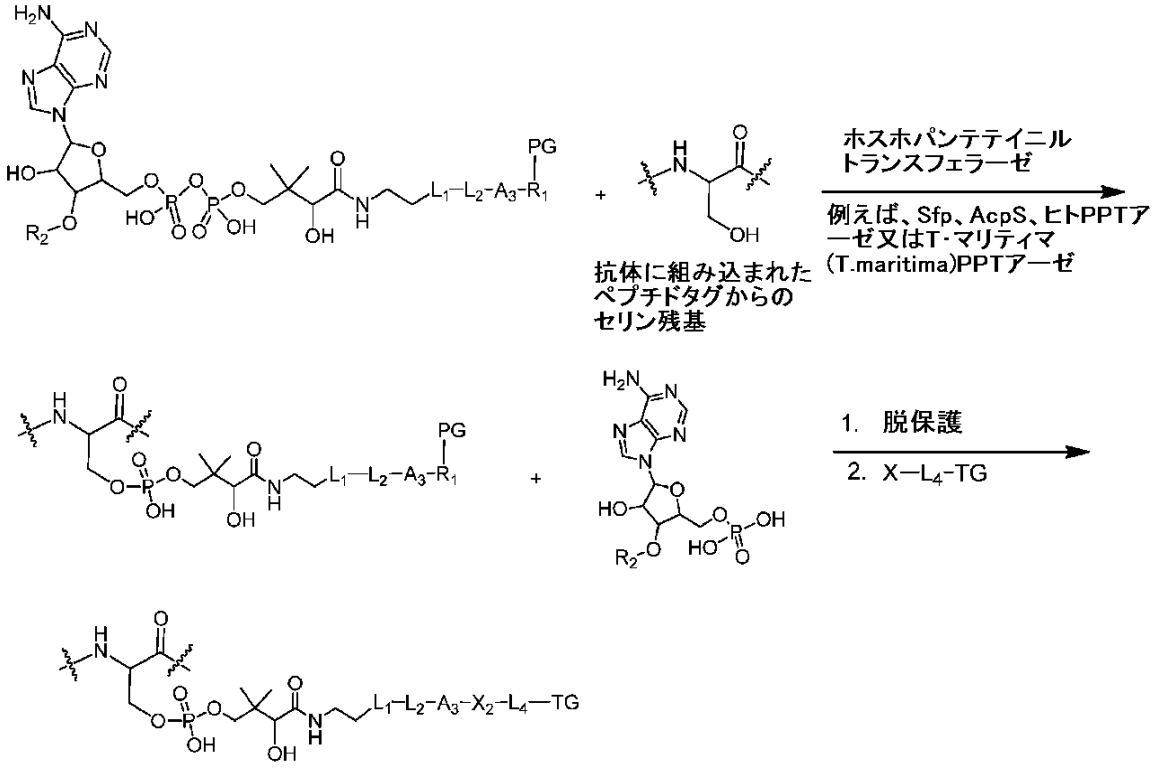
【０４３０】

３ステップ法の別の実施形態をスキーム（ＩＩＩｃ）に示す。

【０４３１】

【化１８６】

スキーム(IIIc)



［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ１、Ｒ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｘ２、Ａ３、Ｌ４、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０４３２】

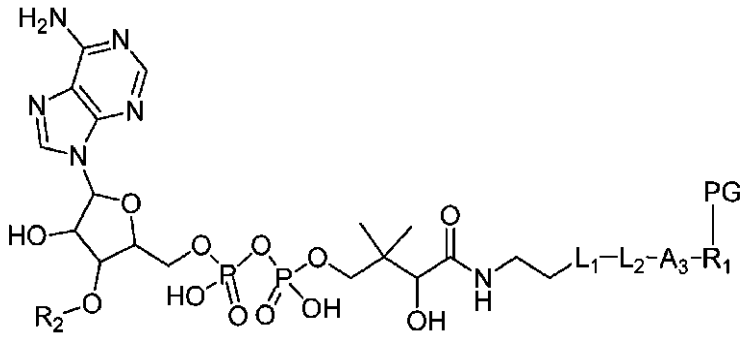
スキーム（ＩＩＩｃ）の３ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｋ）の化合物

【０４３３】

【化１８７】

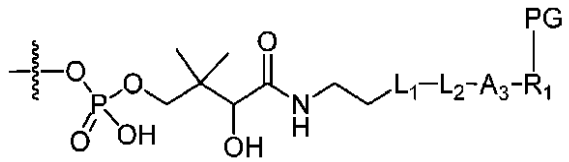


式(K)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｋ－ａ）の保護４’－ホスホパンテテイニル基

【０４３４】

【化１８８】



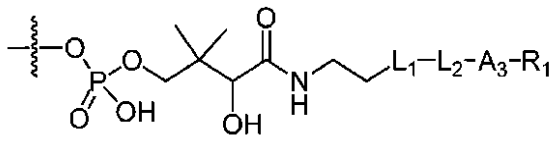
式（Ｋ－ａ）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）保護４’－ホスホパンテテイニル基を脱保護して、式（Ｆ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基：

【０４３５】

【化１８９】



式（Ｆ－ａ）

を得るステップと

（ｄ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩｅ）の化合物：

Ｘ－Ｌ$_4$－ＴＧ

式（ＩＩ－ｅ）

［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ｌ$_3$、Ｌ$_4$、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

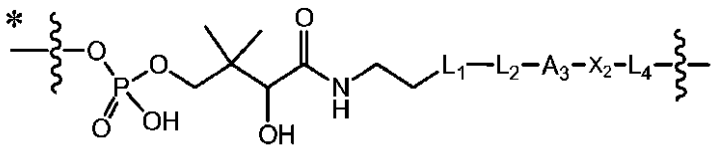
を含む。

【０４３６】

スキーム（ＩＩＩｃ）の２ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩ－ｆ）による構造を有するリンカー：

【０４３７】

【化１９０】



式（II－f）

［式中、Ｌ$_1$、Ｌ$_2$、Ａ$_3$、Ｘ$_2$、およびＬ$_4$は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

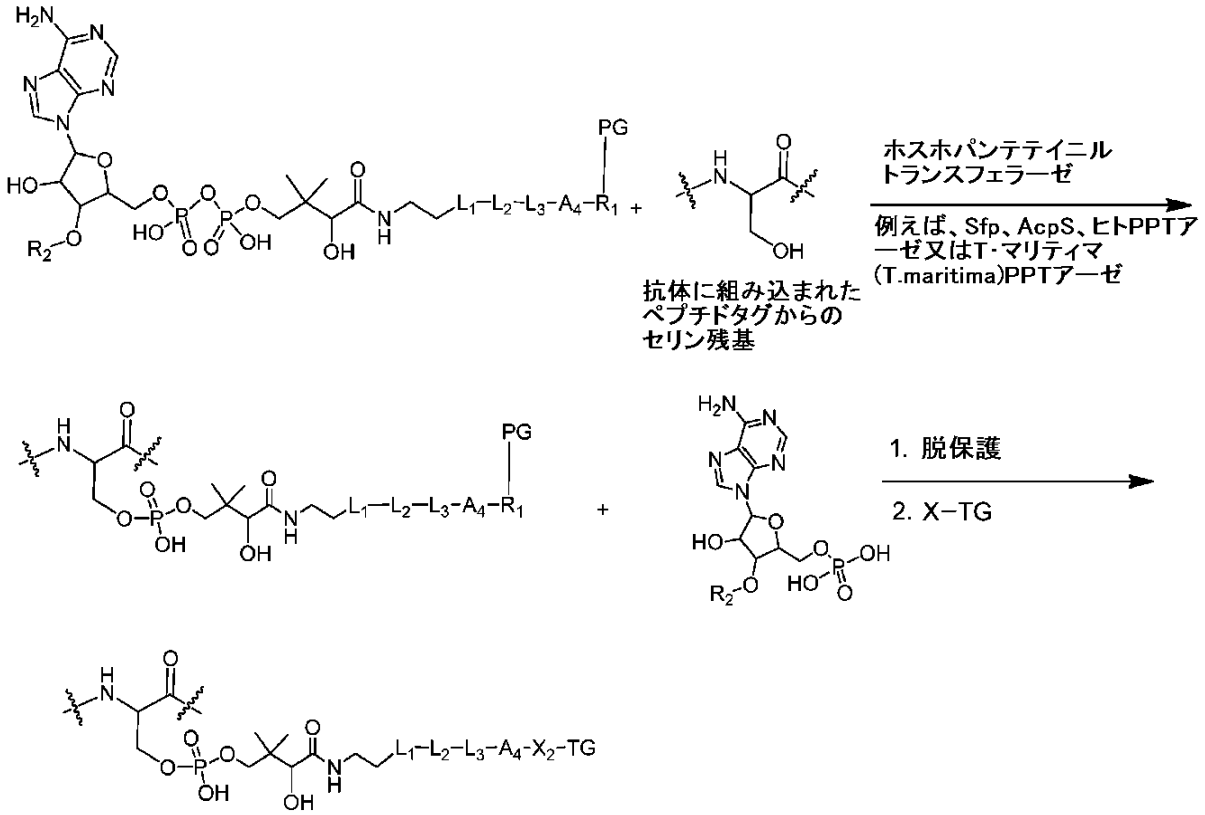
【０４３８】

３ステップ法の別の実施形態をスキーム（ＩＩＩｄ）に示す。

【０４３９】

【化１９１】

スキーム(IIId)



［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ１、Ｒ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ａ４、Ｘ２、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０４４０】

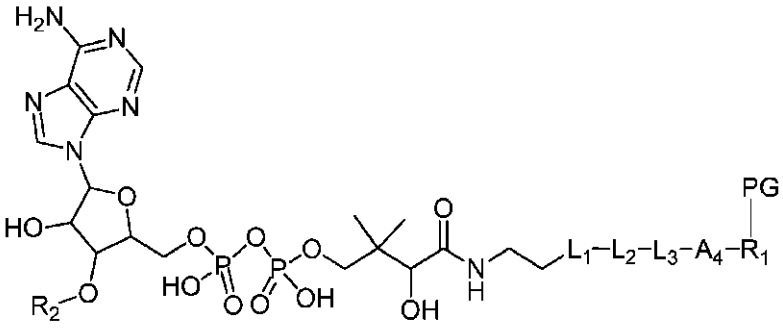
スキーム（ＩＩＩｄ）の３ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）式（Ｌ）の化合物

【０４４１】

【化１９２】

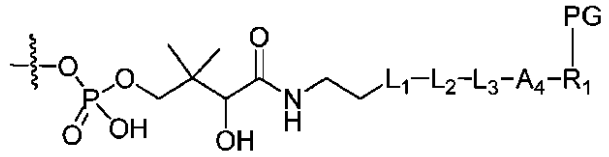


式(L)

が存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、式（Ｌ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基

【０４４２】

【化１９３】



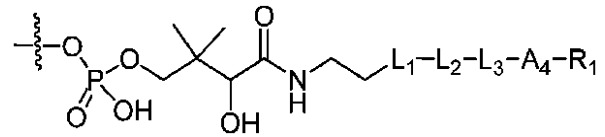
式（Ｌ－ａ）

を短いペプチドタグに結合させることによって、修飾抗体またはその断片を標識するステップと、

（ｃ）保護４’－ホスホパンテテイニル基を脱保護して、式（Ｇ－ａ）の活性化４’－ホスホパンテテイニル基：

【０４４３】

【化１９４】



式（Ｇ－ａ）

を得るステップと

（ｄ）活性化４’－ホスホパンテテイニル基を式（ＩＩ－ｇ）の化合物：

Ｘ－ＴＧ

式（ＩＩ－ｇ）

［式中、ＰＧは保護基であり、Ｘ、Ｒ１、Ｒ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、およびＴＧは本明細書において定義するとおりである］

と反応させるステップと

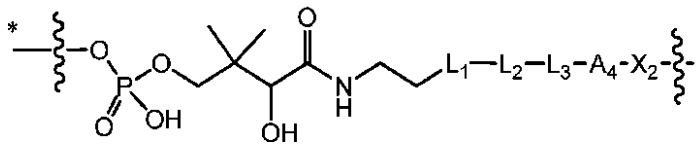
を含む。

【０４４４】

スキーム（ＩＩＩｄ）の３ステップ法の結果として、末端基は、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩ－ｈ）による構造を有するリンカー：

【０４４５】

【化１９５】



式（II－ｈ）

［式中、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ａ４、およびＸ２は、本明細書において定義するとおりであり、＊は修飾４’－ホスホパンテテイニル部分が、小さなペプチドタグに結合することを示している］を介して結合される。

【０４４６】

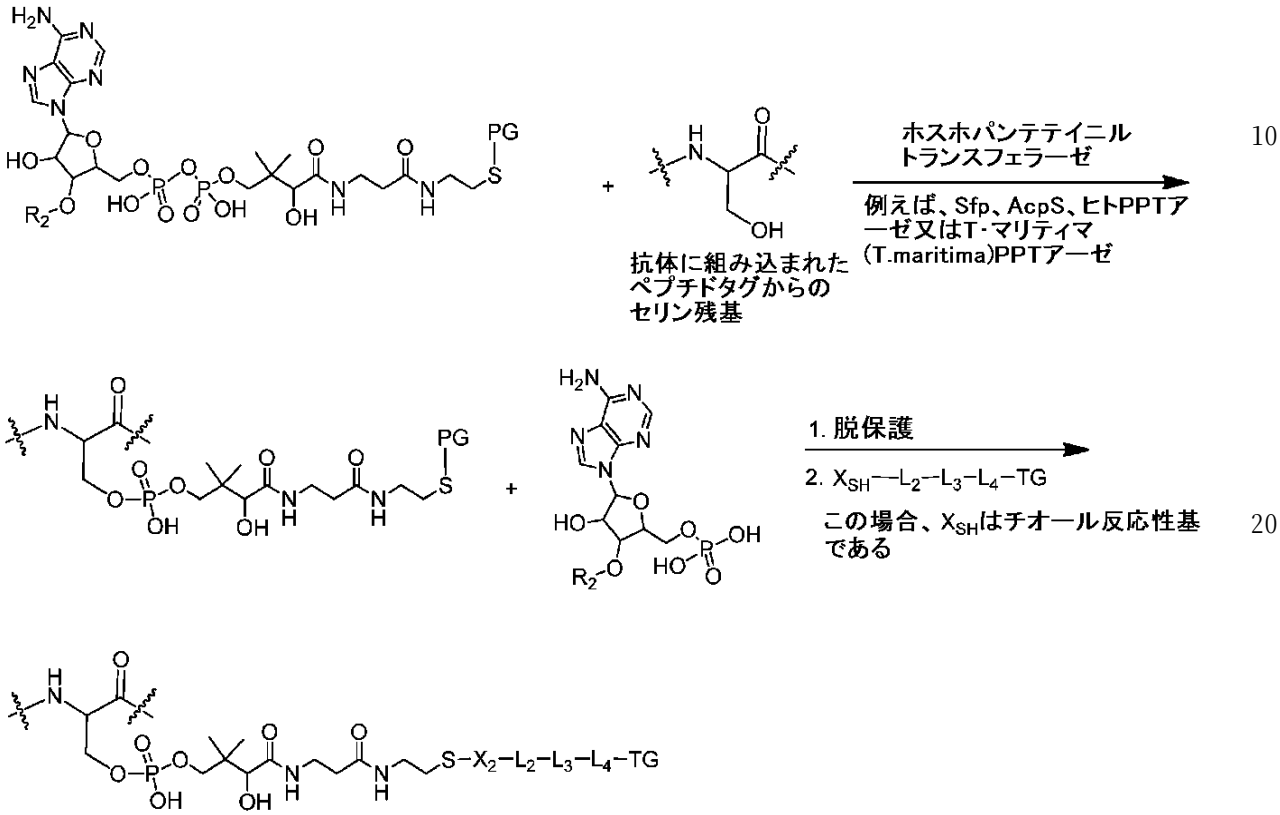
スキーム（ＩＩＩｅ）は、３ステップ法のある特定の実施形態を示しており、この際、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニル補欠分子族のチオールが保護されているＣｏＡ類似体によって部位特異的に標識する。ステップ１では、保護ＣｏＡ類似体を、抗体の中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリンと反応させ、それによって、短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基と共にホスホジエステル結合を形成することを介して、保護チオールを含有する補欠分子族を短いペプチドタグに結合させる。第２ステップでは、チオール保護基を除去し、結果として生じたペンダント４’－ホスホパンテテイニル基を有する修飾抗体またはその断片を、

末端基（ＴＧ）に連結しているチオール反応性基と反応させる。

【０４４７】

【化１９６】

スキーム(IIIe)



［式中、X_{SH}、保護基（ＰＧ）、R_2、A_2、L_3、L_4、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

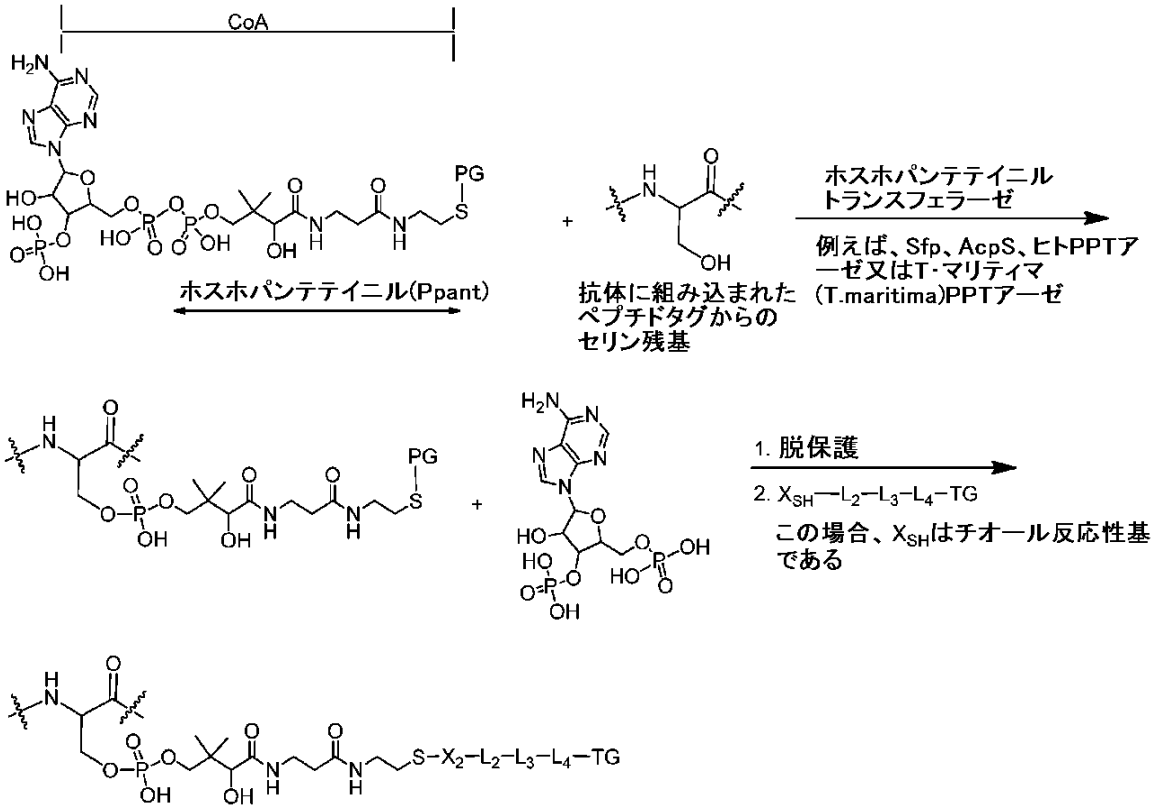
【０４４８】

スキーム（ＩＩＩｆ）は、３ステップ法のある特定の実施形態を示しており、この際、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニル補欠分子族のチオールが保護されているＣｏＡ類似体を使用して部位特異的に標識する。ステップ１では、保護ＣｏＡ類似体を、抗体の中に操作して入れた短いペプチドタグの保存セリンと反応させ、それによって、短いペプチドタグの保存セリン残基のヒドロキシル基と共にホスホジエステル結合を形成することを介して、保護チオールを含有する補欠分子族を短いペプチドタグに結合させる。第２ステップでは、チオール保護基を除去し、結果として生じたペンダント４’－ホスホパンテテイニル基を有する修飾抗体またはその断片を、末端基（ＴＧ）に連結しているチオール反応性基と反応させる。

【０４４９】

【化１９７】

スキーム(IIIf)



［式中、X_{SH}、保護基（ＰＧ）、R_2、A_2、L_3、L_4、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである］。

【０４５０】

スキーム（ＩＩＩｅ）およびスキーム（ＩＩＩｆ）の３ステップ法では、チオール保護基には、これらだけに限定されないが、アセチル、アセトアミドメチル、ベンジル、４－メチルベンジル、４－メトキシベンジル、トリチル、メトキシトリチル、ｔ－ブチル、ｔ－ブチルチオール、および３－ニトロ－２－ピリジンスルフェニルが含まれる。スキーム（ＩＩＩｅ）およびスキーム（ＩＩＩｆ）のチオール反応性基には、これらだけに限定されないが、マレイミド、ハロアセチル、ハロアセトアミド、ピリジルジスルフィド、およびビニルスルホンが含まれる。

【０４５１】

スキーム（ＩＩＩｆ）の３ステップ法は、

（ａ）短いペプチドタグを含有するように操作されており、そのペプチドタグが４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の基質である修飾抗体またはその断片を得るステップと、

（ｂ）修飾抗体またはその断片を、

（ｉ）チオール保護された補酵素Ａが存在する状態で、修飾抗体またはその断片を、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素と共にインキュベートし、それによって、補酵素Ａのチオール保護された補欠分子族を短いペプチドタグに結合させ；

（ｉｉ）チオール基を脱保護し、それによって、ペンダントチオールを有する４’－ホスホパンテテイニル基を形成し、かつ

（ｉｉｉ）４’－ホスホパンテテイニル基のペンダントチオールを式（ＩＩＩｆ）の化合物：

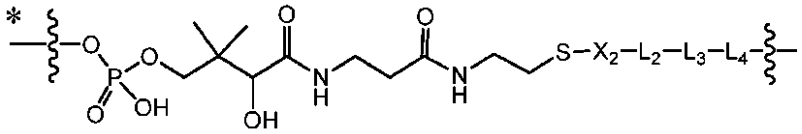
$X_{SH}－L_2－L_3－L_4－TG$

式（ＩＩＩｆ）

［式中、X_{SH}は、これらだけに限定されないが、マレイミド、ハロアセチル、ハロアセトアミド、ピリジルジスルフィド、およびビニルスルホンを含めたチオール反応性基である。A_2、L_3、L_4および、ＴＧは本明細書において定義するとおりである］
と反応させることによって標識するステップと
を含む。加えて、スキーム（ＩＩｆ）の２ステップ法では、末端基を、修飾抗体またはその断片に、式（ＩＩＩ－ａ）の構造を有するリンカー：

【０４５２】

【化１９８】

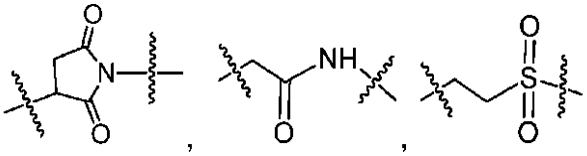


式（III－a）

を介して結合させる。＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分が小さなペプチドタグに結合していることを示し、L_2、L_3、L_4、およびＴＧは、本明細書において定義するとおりである。この実施形態では、X_2は、X_{SH}およびこれらだけに限定されないが、

【０４５３】

【化１９９】



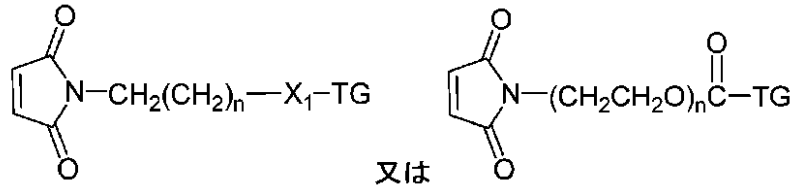
および－Ｓ－Ｓ－を含めた、ペンダントチオールの反応によって形成される基である。

【０４５４】

ある特定の実施形態では、$X_{SH}-L_2-L_3-L_4$－ＴＧは、

【０４５５】

【化２００】

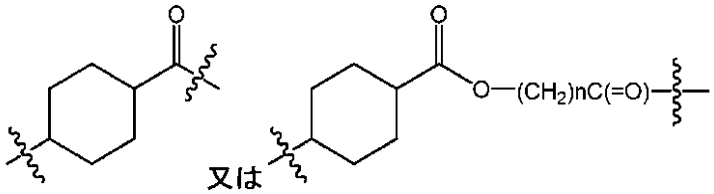


であり、この際、

X_1は、結合、－Ｃ（＝Ｏ）－、－ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$）$_m$－、

【０４５６】

【化２０１】



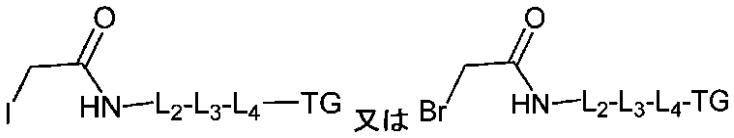
である。

【０４５７】

他の実施形態では、$X_{SH}-L_2-L_3-L_4$－ＴＧは、

【０４５８】

【化２０２】



である。

本明細書に記載の３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物、および発現される修飾抗体またはその断片と同じ細胞内で同時発現される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。本明細書に記載の２ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、細胞培地中で、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物、および同じ細胞または別の細胞によって同時発現される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。本明細書に記載の２ステップ法のある特定の実施形態では、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素を、固体支持体上に固定化する。ある特定の実施形態では、固体支持体は、任意選択により、ビーズまたはカラム上のポリマーからなる。

【０４５９】

３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、同じ細胞中で同時発現される４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼと接触させる。３ステップ法のある特定の実施形態では、チオール保護された補酵素Ａは、アセチル－補酵素Ａである。３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、細胞培地中で、同じまたは別の細胞によって同時発現されるチオール保護された補酵素Ａおよび４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と接触させる。３ステップ法のある特定の実施形態では、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素を、固体支持体上に固定化する。固体支持体は、任意選択により、ビーズまたはカラム上のポリマーからなる。

【０４６０】

本明細書に記載の１ステップ法、２ステップ法、または３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、使用する方法に応じて、式（Ａ）、式（Ｂ）、式（Ｃ）、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、式（Ｇ）、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物、および４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ酵素と、摂氏０～３７度の温度にて、３～１０、好ましくは７～９、最も好ましくは約８のｐＨ値に調整された緩衝液または培地中で、５分～４８時間の反応時間で接触させる。

【０４６１】

本明細書に記載の１ステップ法、２ステップ法、または３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、使用する方法に応じて、式（Ａ）、式（Ｂ）、式（Ｃ）、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、式（Ｇ）、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物と、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが存在する状態で溶液中で接触させる。本明細書に記載の１ステップ法、２ステップ法、または３ステップ法の他の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、使用する方法に応じて、式（Ａ）、式（Ｂ）、式（Ｃ）、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、式（Ｇ）、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物と、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが存在する状態で細胞培地中で接触させる。本明細書に記載の１ステップ法、２ステップ法、または３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、使用する方法に応じて、式（Ａ）、式（Ｂ）、式（Ｃ）、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、式（Ｇ）、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物と、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが存在する状態で細胞内部で接触させる。

【０４６２】

本明細書に記載の１ステップ法、２ステップ法、または３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、使用する方法に応じて、式（Ａ）、式（Ｂ）、式（Ｃ）、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、式（Ｇ）、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物と、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが存在する状態で接触させ、この際、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼは、表面上に固定化されている。ある特定の実施形態では、表面はポリマービーズである。

【０４６３】

本明細書に記載の１ステップ法、２ステップ法、または３ステップ法のある特定の実施形態では、修飾抗体またはその断片を、使用する方法に応じて、式（Ａ）、式（Ｂ）、式（Ｃ）、式（Ｄ）、式（Ｅ）、式（Ｆ）、式（Ｇ）、式（Ｈ）、式（Ｊ）、式（Ｋ）、または式（Ｌ）の構造を有する化合物と、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが存在する状態で接触させ、この際、修飾抗体またはその断片は、表面上に固定化されている。ある特定の実施形態では、表面はポリマービーズである。

【０４６４】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、１、２、３、４、５、６、７、または８の末端基（「ＴＧ」）－対－抗体比で標識し、この際、修飾抗体またはその断片は、抗体の構造的ループ中に設置された１、２、３、４、５、６、７、または８個の短いペプチドタグを含有し、その短いペプチドタグは、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、ＡｃｐＳ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、Ｃ・テルモセルム（C.thermocellum）４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、ヒト４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、またはそれらの変異体型の基質である。例えば、４のＴＧ－対－抗体比は、末端基を、挿入されたＳ６タグの４つのコピーと、または挿入されたｙｂｂＲタグの４つのコピーと、または挿入されたＡ１タグの４つのコピーと、または挿入されたＳ６タグの２つのコピーおよび挿入されたｙｂｂＲタグの２つのコピーの組合せとコンジュゲートすることによって達成される。ある特定の実施形態では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、２種の異なるペプチドタグおよび２種の異なる４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用して、２種の異なる末端基で標識する。例として、Ａ１タグの２つのコピーを、ＡｃｐＳ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用して第１末端基とコンジュゲートする。次いで、第２末端基を、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用して、Ｓ６タグの２つのコピーに結合させる（例えば、Zhouら、ACS Chem. Biol.2:337～346、2007を参照されたい）。

【０４６５】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、１、２、３、４、５、６、７、または８の末端基（ＴＧ）－対－抗体比（例えば、ＤＡＲ）で標識し、この際、修飾抗体またはその断片は、抗体の構造的ループ中に設置された１、２、３、４、５、６、７、または８個の短いペプチドタグを含有し、その短いペプチドタグは、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、ＡｃｐＳ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、Ｃ・テルモセルム（C.thermocellum）４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、ヒト４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、またはそれらの変異体型の基質である。例えば、４のＴＧ－対－抗体比は、薬物部分を、挿入されたＳ６タグの４つのコピーと、または挿入されたｙｂｂＲタグの４つのコピーと、または挿入されたＡ１タグの４つのコピーと、または挿入されたＳ６タグの２つのコピーおよび挿入されたｙｂｂＲタグの２つのコピーの組合せとコンジュゲートすることによって達成される。ある特定の実施形態では、本明細書において提供する修飾抗体またはその断片を、２種の異なるペプチドタグおよび２種の異なる４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用して、２種の異なる薬物部分で標識する。例として、Ａ１タグの２つのコピーを、ＡｃｐＳ　４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用して第１薬

物部分とコンジュゲートする。次いで、第２薬物部分を、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを使用して、Ｓ６タグの２つのコピーに結合させる（例えば、Zhouら、ACS Chem. Biol.2:337～346、2007を参照されたい）。

【０４６６】

３．Ｆｃ領域のフレームワークのさらなる変更

本発明は、部位特異的に標識された免疫コンジュゲートを提供する。本発明の免疫コンジュゲートは、例えば、抗体の特性を改良するために、V_Hおよび／またはV_Lの範囲内のフレームワーク残基に対する修飾をさらに含む修飾抗体またはその断片を含み得る。典型的には、抗体の免疫原性を低下させるために、そのようなフレームワーク修飾を行う。例えば、手法の１つは、１個または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系配列に「復帰変異」させることである。より具体的には、体細胞変異を受けている抗体は、その抗体が由来する生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。そのような残基は、抗体フレームワーク配列を、その抗体が由来する生殖細胞系配列と比較することによって同定することができる。フレームワーク領域配列を、それらの生殖細胞系配置に戻すために、例えば、部位特異的変異誘発によって、体細胞変異を、生殖細胞系配列に「復帰変異」させることができる。そのような「復帰変異」抗体も、本発明に内包されることが意図されている。

【０４６７】

別のタイプのフレームワーク修飾は、Ｔ－細胞エピトープを除去し、それによって、抗体の潜在的な免疫原性を低下させるために、フレームワーク領域内またはさらには１つまたは複数のＣＤＲ領域内の１個または複数の残基の変異を伴う。この手法はまた、「脱免疫化」と称され、Carrらによる米国特許出願公開第２００３０１５３０４３号にさらに詳細に記載されている。

【０４６８】

フレームワークまたはＣＤＲ領域内で行われる修飾に加えて、またはその代わりに、本発明の抗体を、Ｆｃ領域内に修飾を含むように、典型的には、血清半減期、補体結合、Ｆｃ受容体結合、および／または抗原依存性細胞傷害活性などの抗体の１つまたは複数の機能特性を変更するように、操作することができる。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾するか（例えば、１個または複数の化学部分を、抗体に結合させることができる）、またはそのグリコシル化を変更し、再び、抗体の１つまたは複数の機能特性を変更するように修飾することができる。これらの実施形態はそれぞれ、下記でさらに詳細に記載する。

【０４６９】

一実施形態では、ＣＨ１のヒンジ領域を修飾して、ヒンジ領域中のシステイン残基の数を変更して、例えば、増加または減少させるようにする。この手法は、Bodmerらによる米国特許第５，６７７，４２５号においてさらに記載されている。ＣＨ１のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変更して、例えば、軽鎖および重鎖のアセンブリを促進するか、または抗体の安定性を増大または低下させる。

【０４７０】

別の実施形態では、抗体のＦｃヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、１個または複数のアミノ酸変異を、Ｆｃヒンジ断片のＣＨ２－ＣＨ３ドメインインターフェース領域に導入して、抗体が、固有のＦｃヒンジドメインＳｐＡ結合に対して減退したブドウ球菌タンパク質Ａ（ＳｐＡ）の結合を有するようにする。この手法は、Wardらによる米国特許第６，１６５，７４５号にさらに詳細に記載されている。

【０４７１】

まだ他の実施形態では、少なくとも１個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えて、抗体のエフェクター機能を変更することによって、Ｆｃ領域を変更する。例えば、抗体がエフェクターリガンドのために変更されたアフィニティーを有するが、親抗体の抗原結合能力は維持するように、１個または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基と置き換えることができる。アフィニティーが変更されるエフェクターリガンドは、例えば、Ｆｃ

受容体または補体のＣ１成分であってよい。この手法は、例えば、両方ともWinterらによる米国特許第５，６２４，８２１号および同第５，６４８，２６０号に記載されている。

【０４７２】

別の実施形態では、抗体がＣ１ｑ結合を変更し、かつ／または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を低減または廃止するように、アミノ酸残基から選択される１個または複数のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置き換えることができる。この手法は、例えば、Idusogieらによる米国特許第６，１９４，５５１号に記載されている。

【０４７３】

別の実施形態では、１個または複数のアミノ酸残基を変更し、それによって、抗体が補体を固定する能力を変更する。この手法は、例えば、BodmerらによるＰＣＴ公報ＷＯ９４／２９３５１に記載されている。具体的な実施形態では、本発明の抗体またはその断片の１個または複数のアミノ酸を、ＩｇＧ１サブクラスおよびκアイソタイプのために図４において示されているものなどの１個または複数のアロタイプアミノ酸残基によって置き換える。アロタイプアミノ酸残基にはまた、これらだけに限定されないが、Jefferisら、MAbs. 1:332～338(2009)によって記載されているとおりのＩｇＧ１、ＩｇＧ２、およびＩｇＧ３サブクラスの重鎖の定常領域、さらには、κアイソタイプの軽鎖の定常領域が含まれる。

【０４７４】

まだ別の実施形態では、１個または複数のアミノ酸を修飾することによって、抗体の抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を媒介する能力を増大させ、かつ／またはＦｃγ受容体に対する抗体のアフィニティーを増大させるように、Ｆｃ領域を修飾する。この手法は、例えば、PrestaによるＰＣＴ公報ＷＯ００／４２０７２に記載されている。さらに、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、ＦｃγＲＩＩＩ、およびＦｃＲｎについてのヒトＩｇＧ１上の結合部位はマッピングされていて、結合が改善されたバリアントは記載されている（Shieldsら、J. Biol. Chem. 276:6591～6604、2001を参照されたい）。

【０４７５】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化を修飾する。例えば、非グリコシル化（aglycosylated）抗体を作製することができる（すなわち、その抗体はグリコシル化を欠いている）。グリコシル化を変更して、例えば「抗原」に対する抗体のアフィニティーを高めることができる。そのような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つまたは複数のグリコシル化部位を変更することによって達成することができる。例えば、１つまたは複数のアミノ酸置換を行うことができ、結果として、１個または複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位を消失させ、それによって、その部位でのグリコシル化を消失させる。そのような非グリコシル化は、抗原に対する抗体のアフィニティーを増大させ得る。そのような手法は、例えば、Coらによる米国特許第５，７１４，３５０号および同第６，３５０，８６１号に記載されている。

【０４７６】

加えて、または代わりに、少ない量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体または二分性ＧｌｃＮａｃ構造が増加している抗体などの変更型のグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような変更グリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能力を増大させることが実証されている。そのような炭水化物修飾は、例えば、変更グリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることによって達成することができる。変更グリコシル化機構を有する細胞は、当技術分野で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによって、変更グリコシル化を有する抗体を生成する宿主細胞として使用することができる。例えば、Hangらによる欧州特許第１，１７６，１９５号は、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞系を記載しており、この遺伝子は、フコシルトランスフェラーゼをコードするので、そのような細胞系中で発現された抗体は、低フコシル化を示すようになる。PrestaによるＰＣＴ公報ＷＯ０３／０３５８３５は、フコースをＡｓｎ（２９７）連結炭水化物に結合させる能力が低下しており、その結果、その宿主細胞中で発現された抗体の低フコシル化が生じるバリアントＣＨＯ細胞系、Ｌｅｃｌ３細胞を記

載している（Shieldsら、(2002)J. Biol. Chem. 277:26733～26740も参照されたい）。UmanaらによるＰＣＴ公報ＷＯ９９／５４３４２は、糖タンパク質修飾性グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、β（１，４）－ＮアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作されていて、その操作された細胞系において発現される抗体が、抗体のＡＤＣＣ活性を結果として上昇させる二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示すような細胞系を記載している（Umanaら、Nat. Biotech. 17:176～180、1999も参照されたい）。

【０４７７】

別の実施形態では、抗体を、その生物学的半減期を増加させるように修飾する。様々な手法が可能である。例えば、Wardに付与された米国特許第６，２７７，３７５号に記載されているとおり、以下の変異のうちの１つまたは複数を導入することができる：Ｔ２５２Ｌ、Ｔ２５４Ｓ、Ｔ２５６Ｆ。別法では、生物学的半減期を増加させるために、Prestaらによる米国特許第５，８６９，０４６号および同第６，１２１，０２２号に記載されているとおり、ＩｇＧのＦｃ領域のＣＨ２ドメインの２つのループから取り出されたサルベージ受容体結合エピトープを含有するように、抗体をＣＨ１またはC_L領域内で変更することができる。

【０４７８】

４．抗体コンジュゲート

本発明は、部位特異的標識法、それによって調製される修飾抗体およびその断片、ならびに免疫コンジュゲートを提供する。本発明の方法を使用して、修飾抗体またはその断片を、薬物部分、例えば、抗癌薬、自己免疫治療薬、抗炎症薬、抗真菌薬、抗菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、または麻酔薬などの標識とコンジュゲートすることができる。抗体またはその断片を、いくつかの同一か、または異なる標識部分を使用し、本発明の方法を他のコンジュゲーション方法と組み合わせてコンジュゲートすることもできる。

【０４７９】

ある特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートの末端基は、Ｖ－ＡＴＰアーゼ阻害薬、ＨＳＰ９０阻害薬、ＩＡＰ阻害薬、ｍＴｏｒ阻害薬、微小管安定薬、微小管不安定化薬、オーリスタチン、ドラスタチン、マイタンシノイド、ＭｅｔＡＰ（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質ＣＲＭ１の核外輸送の阻害薬、ＤＰＰＩＶ阻害薬、プロテアソーム阻害薬、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害薬、タンパク質合成阻害薬、キナーゼ阻害薬、ＣＤＫ２阻害薬、ＣＤＫ９阻害薬、Ｅｇ５阻害薬、ＨＤＡＣ阻害薬、ＲＮＡポリメラーゼ阻害薬、ＤＮＡ損傷薬、ＤＮＡアルキル化薬、ＤＮＡインターカレーター、ＤＮＡ小溝結合薬、およびＤＨＦＲ阻害薬から選択される。

【０４８０】

さらに、本発明の修飾抗体または抗体断片は、所与の生物学的応答を修飾する治療用部分または薬物部分とコンジュゲートすることができる。治療用部分または薬物部分は、古典的な化学的治療薬に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドであってよい。そのようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素、コレラ毒素、またはジフテリア毒素などの毒素、腫瘍壊死因子、α－インターフェロン、β－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化因子、サイトカインなどのタンパク質、アポトーシス薬、抗血管新生薬、または例えば、リンホカインなどの生物学的応答修飾薬が含まれ得る。

【０４８１】

一実施形態では、本発明の修飾抗体または抗体断片を、細胞毒、薬物（例えば、免疫抑制薬）、または放射性毒素などの治療用部分とコンジュゲートする。細胞毒の例には、これらだけに限定されないが、タキサン（例えば、国際（ＰＣＴ）特許出願ＷＯ０１／３８３１８およびＰＣＴ／ＵＳ０３／０２６７５を参照されたい）、ＤＮＡ－アルキル化薬（例えば、ＣＣ－１０６５類似体）、アンスラサイクリン、ツブリシン類似体、デュオカルマイシン類似体、オーリスタチンＥ、オーリスタチンＦ、マイタンシノイド、および反応

性ポリエチレングリコール部分を含む細胞傷害性薬（例えば、Sasseら、J. Antibiot.（東京）、53、879～85 (2000)、Suzawaら、Bioorg. Med. Chem.、8、2175～84 (2000)、Ichimuraら、J. Antibiot.（東京)、44、1045～53 (1991)、Franciscoら、Blood (2003)（印刷による公開の前に電子的に公開）、米国特許第５，４７５，０９２号、同第６，３４０，７０１号、同第６，３７２，７３８号、および同第６，４３６，９３１号、米国特許出願公開第２００１／００３６９２３　Ａ１号、係属中の米国特許出願第１０／０２４，２９０号および同第１０／１１６，０５３号、および国際（ＰＣＴ）特許出願ＷＯ　０１／４９６９８を参照されたい）、タキソン（taxon）、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ｔ．コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、およびそれらの類似体または相同体が含まれる。治療薬にはまた、例えば、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、切除薬（ablating agent）（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラキスンブシル（thioepa chloraxnbucil）、メイファラン（meiphalan）、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロトスファミド（cyclothosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧名ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧名アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（ＡＭＣ））、および抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）（例えば、Seattle Genetics、ＵＳ２００９０３０４７２１を参照されたい）が含まれる。

【０４８２】

本発明の修飾抗体または抗体断片とコンジュゲートすることができる治療用細胞毒の他の例には、デュオカルマイシン、カリチアマイシン、メイタンシン、およびオーリスタチン、ならびにそれらの誘導体が含まれる。カリチアマイシン抗体コンジュゲートの例は、市販されている（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標）；Ｗｙｅｔｈ－Ａｙｅｒｓｔ）。

【０４８３】

細胞毒の種類、抗体に治療薬をコンジュゲートするためのリンカー、および方法のさらなる論述については、Saitoら、(2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199～215; Trailら、(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328～337; Payne、(2003) Cancer Cell 3:207～212; Allen、(2002) Nat. Rev. Cancer 2:750～763; PastanおよびKreitman、(2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089～1091; SenterおよびSpringer、(2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247～264も参照されたい。

【０４８４】

本発明によれば、修飾抗体またはその断片を、細胞傷害性放射性医薬品を生成する放射性同位体とコンジュゲートすることもでき、これは、放射性免疫コンジュゲートと称される。診断用または治療用に使用するために抗体とコンジュゲートすることができる放射性同位体の例には、これらだけに限定されないが、ヨウ素^{131}、インジウム^{111}、イットリウム^{90}、およびルテニウム^{177}が含まれる。放射性免疫コンジュゲートを調製するための方法は、当技術分野で確立されている。Ｚｅｖａｌｉｎ（商標）（ＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）およびＢｅｘｘａｒ（商標）（Ｃｏｒｉｘａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）を含めた放射性免疫コンジュゲートの例は市販されており、同様の方法を使用して、本発明の抗体を使用して、放射性免疫コンジュゲートを調製することができる。ある特定の実施形態では、大環状キレーターは、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－テトラ酢酸（ＤＯＴＡ）であり、これを、抗体にリンカー分子を介して結合することができる。そのようなリンカー分子は、当

技術分野で一般に公知であり、Denardoら、(1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483～90; Petersonら、(1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553～7; およびZimmermanら、(1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943～50に記載されており、これらはそれぞれ、その全体が参照によって組み込まれている。

【０４８５】

本発明はさらに、異種タンパク質またはポリペプチド（またはその断片、好ましくは少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０または少なくとも１００アミノ酸のポリペプチド）とコンジュゲートした抗原に特異的に結合して、融合タンパク質を生成する修飾抗体またはその断片を提供する。とりわけ、本発明は、本明細書に記載の抗体断片（例えば、Ｆａｂ断片、Ｆｄ断片、Ｆｖ断片、Ｆ（ａｂ）２断片、V_Hドメイン、V_H ＣＤＲ、V_Lドメイン、またはV_L ＣＤＲ）と、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。

【０４８６】

追加の融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および／またはコドンシャッフリング（総称して、「ＤＮＡシャッフリング」と称される）の技法を介して生成することができる。ＤＮＡシャッフリングを使用して、本発明の抗体またはその断片の活性を変更することができる（例えば、より高いアフィニティーおよびより低い解離速度を有する抗体またはその断片）。一般に、米国特許第５，６０５，７９３号、同第５，８１１，２３８号、同第５，８３０，７２１号、同第５，８３４，２５２号、および同第５，８３７，４５８号；Pattenら、(1997) Curr. Opinion Biotechnol. 8:724～33; Harayama、(1998) Trends Biotechnol. 16(2):76～82; Hanssonら、(1999) J. Mol. Biol. 287:265～76;およびLorenzoおよびBlasco、(1998) Biotechniques 24(2):308～313を参照されたい（これらの特許および刊行物はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれている）。組換え前にエラープローンＰＣＲによるランダム変異誘発、ランダムヌクレオチド挿入、または他の方法に掛けることによって、抗体もしくはその断片、またはコードされる抗体もしくはその断片を変更することができる。抗原に特異的に結合する抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドを、１種または複数の異種分子の１つまたは複数の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などと組み換えることができる。

【０４８７】

さらに、本発明の修飾抗体またはその断片を、精製を容易にするペプチドなどのマーカー配列とコンジュゲートすることができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、その多くが市販されているｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ、Ｉｎｃ．、９２５９ Ｅｔｏｎ Ａｖｅｎｕｅ、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、ＣＡ、９１３１１）に備えられているタグなどのヘキサ－ヒスチジンペプチド（配列番号１１０６）である。Gentzら、(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821～824において記載されているとおり、例えば、ヘキサ－ヒスチジン（配列番号１１０６）は、融合タンパク質の簡便な精製をもたらす。精製のために有用な他のペプチドタグには、これらだけに限定されないが、インフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する血球凝集素（「ＨＡ」）タグ（Wilsonら、(1984)Cell 37:767）、および「ＦＬＡＧ」タグ（A. Einhauerら、J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455～465、2001）が含まれる。本発明によれば、抗体または抗体断片を、それらの有効性を増強するために、腫瘍浸透性ペプチドとコンジュゲートすることもできる。

【０４８８】

他の実施形態では、本発明の修飾抗体または抗体断片を、診断薬または検出可能な薬剤とコンジュゲートする。そのような免疫コンジュゲートは、特定の療法の有効性を決定するなどの臨床的な検査手順の一部として、疾患または障害の発症、展開、進行、および／または重症度をモニタリングまたは予後判定するために有用であり得る。そのような診断および検出は、抗体を、これらだけに限定されないが、ホースラディッシュペルオキシダ

ーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの様々な酵素；これらだけに限定されないが、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンなどの補欠分子族；これらだけに限定されないが、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ３５０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４０５、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４３０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５００、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５１４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５３２、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５５５、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５６８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６１０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６３３、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６６０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６８０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７００、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７５０、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンなどの蛍光物質；これらだけに限定されないが、ルミノールなどの発光物質；これらだけに限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどの生物発光物質；これらだけに限定されないが、ヨウ素（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、および^{121}Ｉ、）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115}Ｉｎ、^{113}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、および^{111}Ｉｎ、）、テクネチウム（^{99}Ｔｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、４７Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}Ｒｈ、^{97}Ｒｕ、^{68}Ｇｅ、^{57}Ｃｏ、^{65}Ｚｎ、^{85}Ｓｒ、^{32}Ｐ、^{153}Ｇｄ、^{169}Ｙｂ、^{51}Ｃｒ、^{54}Ｍｎ、^{75}Ｓｅ、^{64}Ｃｕ、^{113}Ｓｎ、および^{117}Ｓｎなどの放射性物質；ならびに様々な陽電子放射型断層撮影を使用する陽電子放射性金属および非放射性常磁性金属イオンを含むが、これらだけに限定されない検出可能な物質とカップリングさせることによって、達成することができる。

【０４８９】

本発明の修飾抗体または抗体断片は、イムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用な固体支持体に結合させることもできる。そのような固体支持体には、これらだけに限定されないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが含まれる。

【０４９０】

５．医薬組成物

免疫コンジュゲートを含む医薬組成物または滅菌組成物を調製するために、本発明の免疫コンジュゲートを、薬学的に許容される担体または添加剤と混合する。組成物は追加的に、癌（乳癌、結腸直腸癌、肺癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、肝臓癌、胃癌、膵臓癌、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨肉腫、扁平上皮細胞癌、末梢神経梢腫瘍　神経鞘腫、頭頚部癌、膀胱癌、食道癌、バレット食道癌、神経膠芽細胞腫、軟部組織の明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎臓癌、黒色腫、前立腺癌、良性前立腺肥大症（ＢＰＨ）、女性化乳房（gynacomastica）、および子宮内膜症）を治療または防止するために適した１種または複数の他の治療薬を含有することができる。

【０４９１】

治療薬および診断薬の製剤は、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液、ローション、または懸濁液の形態の生理学的に許容される担体、添加剤、または安定剤と混合することによって調製することができる（例えば、Hardmanら、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill、New York、N.Y.、2001; Gennaro、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、Lippincott、Williams, and Wilkins、New York、N.Y.、2000; Avisら(編)、Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications、Marcel Dekker、NY、1993; Liebermanら(編)、Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets、Marcel Dekker、NY、1990; Liebermanら(編) Pharmaceutical Dosage Forms:

Disperse Systems、Marcel Dekker、NY、1990; WeinerおよびKotkoskie、Excipient Toxicity and Safety、Marcel Dekker, Inc.、New York、N.Y.、2000を参照されたい）。

【０４９２】

治療薬の投与レジメンの選択は、実体の血清または組織回転速度、症状のレベル、実体の免疫原性、および生物学的マトリックス中での標的細胞のアクセス性を含めたいくつかの因子に依存する。ある特定の実施形態では、投与レジメンは、許容される副作用レベルに合わせて、患者に送達される治療薬の量を最大化する。したがって、送達される生物学的薬剤の量は部分的に、治療される特定の実体および状態の重症度に依存する。抗体、サイトカイン、および小分子の適切な用量を選択する際には、ガイダンスが利用可能である（例えば、Wawrzynczak、Antibody Therapy、Bios Scientific Pub. Ltd、Oxfordshire、UK、1996; Kresina (編)、Monoclonal Antibodies、Cytokines and Arthritis、Marcel Dekker、New York、N.Y.、1991; Bach (編)、Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases、Marcel Dekker、New York、N.Y.、1993; Baertら、New Engl. J. Med. 348:601～608、2003; Milgromら、New Engl. J. Med. 341:1966～1973、1999; Slamonら、New Engl. J. Med. 344:783～792、2001; Beniaminovitzら、New Engl. J. Med. 342:613～619、2000; Ghoshら、New Engl. J. Med. 348:24～32、2003; Lipskyら、New Engl. J. Med. 343:1594～1602、2000を参照されたい）。

【０４９３】

適切な用量の決定は、臨床家によって、例えば、治療に影響を及ぼすと当技術分野で知られているか、もしくは疑われているか、または治療に影響を及ぼすと予想されているパラメータまたは因子を使用して行われる。一般に、用量は、最適な用量よりもやや少ない量で始まり、その後、所望か、または最適な効果が、何らかの負の副作用に対して達成されるまで、用量は少量刻みで増やされる。重要な診断尺度には、例えば炎症の症状または産生される炎症性サイトカインのレベルの診断尺度が含まれる。

【０４９４】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬レベルを、患者に対して毒性であることなく、特定の患者、組成、および投与方式について所望の治療的応答を達成するために有効な活性成分の量が得られるように、変化させることができる。選択される投薬レベルは、使用される本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排泄速度、治療期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および／または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康、および以前の病歴、ならびに医学分野で知られている同様の因子を含めた様々な薬物動態因子に依存するであろう。

【０４９５】

本発明の抗体またはその断片を含む組成物は、連続的な注入によって、または例えば、１日、１週、または１週間あたり１～７回の間隔での投与によって提供することができる。用量を、静脈内、皮下、局所、経口、経鼻、直腸、筋肉内、脳内で、または吸入によって提供することができる。具体的な投与プロトコルは、重大な望ましくない副作用を回避する最大用量または投与頻度を伴うものである。

【０４９６】

本発明の免疫コンジュゲートでは、患者に投与される投薬量は、患者の体重につき０．０００１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇであってよい。投薬量は、患者の体重につき０．０００１ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ、０．０００１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、０．０００１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、０．０００１～２ｍｇ／ｋｇ、０．０００１～１ｍｇ／ｋｇ、０．０００１ｍｇ／ｋｇ～０．７５ｍｇ／ｋｇ、０．０００１ｍｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０００１ｍｇ／ｋｇ～０．２５ｍｇ／ｋｇ、０．０００１～０．１５ｍｇ／ｋｇ、０．０００１～０．１０ｍｇ／ｋｇ、０．００１～０．５ｍｇ／ｋｇ、０．０１～０．２５ｍｇ／ｋｇまたは０．０１～０．１０ｍｇ／ｋｇであってよい。本発明の抗体またはその断片の投薬量は、キログラムでの患者の体重（ｋｇ）を使用して、それに投与用量（ｍｇ／ｋｇ）を掛けることによって計算することができる。

【０４９７】
本発明の免疫コンジュゲートの用量は繰り返すことができ、その投与を少なくとも１日、２日、３日、５日、１０日、１５日、３０日、４５日、２ヶ月、７５日、３ヶ月、または少なくとも６ヶ月離すことができる。具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートの投与を、３週間毎に繰り返す。
【０４９８】
特定の患者についての有効量は、治療される状態、患者の全体的な健康、投与の方法経路および用量、ならびに副作用の重症度などの因子に応じて変化し得る（例えば、Maynardら、A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice、Interpharm Press、Boca Raton、Fla.、1996; Dent、Good Laboratory and Good Clinical Practice、Urch Publ.、London、UK、2001を参照されたい）。
【０４９９】
投与経路は、例えば、局所もしくは皮膚塗布、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、病変内による注射もしくは注入によって、または持続放出系もしくインプラントによるものであってよい（例えば、Sidmanら、Biopolymers 22:547～556、1983;Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15:167～277、1981;Langer、Chem. Tech. 12:98～105、1982;Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688～3692、1985;Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030～4034、1980；米国特許第６，３５０，４６６号および同第６，３１６，０２４号を参照されたい）。必要な場合には、組成物は、注射部位での疼痛を和らげるリドカインなどの可溶化剤および局所麻酔薬を含んでもよい。加えて、例えば、吸入器またはネブライザー、およびエアゾール化剤を含む製剤を使用することによって、肺投与を使用することもできる。例えば、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第６，０１９，９６８号、同第５，９８５，３２０号、同第５，９８５，３０９号、同第５，９３４，２７２号、同第５，８７４，０６４号、同第５，８５５，９１３号、同第５，２９０，５４０号、および同第４，８８０，０７８号；ならびにＰＣＴ公報ＷＯ９２／１９２４４、ＷＯ９７／３２５７２、ＷＯ９７／４４０１３、ＷＯ９８／３１３４６、およびＷＯ９９／６６９０３を参照されたい。
【０５００】
本発明の組成物は、１種または複数の投与経路を介して、当技術分野で公知の１種または複数の様々な方法を使用して投与することもできる。当業者には分かるであろうが、投与経路および／または形式は、所望の結果に応じて変化する。本発明の免疫コンジュゲートのために選択される投与経路には、例えば、注射または注入による静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、または他の非経口投与経路が含まれる。非経口投与は、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与様式を表し得、これには、限定ではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内注射および注入が含まれる。別法では、本発明の組成物を、局所、表皮、または粘膜投与経路などの非－非経口経路を介して、例えば、鼻腔内、経口、膣、直腸、舌下、または局所で投与することができる。一実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートを注入によって投与する。別の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートを皮下投与する。
【０５０１】
本発明の免疫コンジュゲートを制御放出または持続放出系で投与する場合、ポンプを使用して、制御または持続放出を達成することができる（Langer、前出；Sefton、CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20、1987; Buchwaldら、Surgery 88:507、1980; Saudekら、N. Engl. J. Med. 321:574、1989を参照されたい）。ポリマー物質を使用して、本発明の療法の制御または持続放出を達成することができる（例えば、Medical Applications of Controlled Release、LangerおよびWise (編)、CRC Pres.、Boca Raton、Fla.、1974; Controlled Drug Bioavailability、Drug Product Design and Performance、Smolen およびBall(編)、Wiley、New York、1984; RangerおよびPeppas、J. Macromol. Sci. Rev. Macromo

l. Chem. 23:61、1983を参照されたい;また、Levyら、Science 228:190、1985; Duringら、Ann. Neurol. 25:351、1989; Howardら、J. Neurosurg. 7 1:105、1989；米国特許第５，６７９，３７７号；米国特許第５，９１６，５９７号；米国特許第５，９１２，０１５号；米国特許第５，９８９，４６３号；米国特許第５，１２８，３２６号；ＰＣＴ公報ＷＯ９９／１５１５４；およびＰＣＴ公報ＷＯ９９／２０２５３を参照されたい。持続放出製剤で使用されるポリマーの例には、これらだけに限定されないが、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリラート）、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－ｃｏ－ビニルアセタート）、ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（ＰＬＧ）、ポリ無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）、およびポリオルトエステルが含まれる。一実施形態では、持続放出製剤で使用されるポリマーは、不活性であり、浸出性の不純物を含まず、貯蔵、滅菌、および生分解性において安定している。制御または持続放出系は、予防のまたは治療標的の近くに設置することができるので、全身用量の数分の一のみを必要とする（例えば、上記のGoodson, Medical Applications of Controlled Release、vol. 2、pp. 115～138、1984を参照されたい）。

【０５０２】

制御放出系は、Langer（Science 249:1527～1533、1990）による総説において論述されている。当業者に公知の任意の技法を使用して、１種または複数の本発明の免疫コンジュゲートを含む持続放出製剤を生成することができる。例えば、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第４，５２６，９３８号、ＰＣＴ公報ＷＯ９１／０５５４８、ＰＣＴ公報ＷＯ９６／２０６９８、Ningら、Radiotherapy & Oncology 39:179～189、1996; Songら、PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372～397、1995; Cleekら、Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853～854、1997;およびLamら、Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759～760、1997を参照されたい。

【０５０３】

本発明の免疫コンジュゲートを局所投与する場合、それらを軟膏剤、クリーム剤、経皮貼付剤、ローション剤、ゲル剤、シャンプー剤、スプレー剤、エアゾール剤、液剤、乳剤の形態で、または当業者に周知の他の形態で製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms、19th ed.、Mack Pub. Co.、Easton、Pa. (1995)を参照されたい。噴霧不可能な局所剤形では、局所塗布に適合性の担体または１種または複数の添加剤を含み、かつ場合によっては、水より高い動力学粘度を有する粘稠性から半固体または固体形態を典型的には使用する。適切な製剤には、限定ではないが、液剤、懸濁剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、リニメント剤、膏薬などが含まれ、これらを所望の場合には、補助剤（例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤、緩衝剤、または塩）で滅菌するか、またはそれらと混合して、例えば、浸透圧などの様々な特性に影響を及ぼす。他の適切な局所用剤形には、噴霧可能なエアゾール製剤が含まれ、この際、活性成分を、場合によっては、固体または液体不活性担体と組み合わせて、加圧揮発性物質（例えば、フレオンなどの気体噴射剤）と混合してパッケージングするか、またはスクイズボトルにパッケージングする。所望の場合には保湿剤または湿潤剤を、医薬組成物および剤形に加えることもできる。そのような追加の成分の例は、当技術分野で周知である。

【０５０４】

免疫コンジュゲートを含む組成物を鼻腔内投与する場合には、これを、エアゾール形態、スプレー剤、ミスト剤に、または滴剤の形態に製剤化することができる。とりわけ、本発明に従って使用するための予防薬または治療薬は好都合に、適切な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切な気体）を使用することで、エアゾールスプレー剤提示の形態で、加圧パックまたはネブライザーから送達することができる。加圧エアゾールの場合

には、投薬単位を、計測量を送達するためのバルブを装備することによって決定することができる。吸入器または注入器で使用するためのカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンから構成）は、化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの適切な散剤基剤との粉末混合物を含有するように製剤化することができる。

【０５０５】

第２治療薬、例えば、サイトカイン、ステロイド、化学療法薬、抗生物質、または放射線と共に同時投与または治療する方法は、当技術分野で公知である（例えば、Hardmanら(編) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、10.sup.th ed.、McGraw-Hill、New York、N.Y.; Poole and Peterson(編) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach、Lippincott、Williams & Wilkins、Phila.、Pa.; ChabnerおよびLongo (編) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy、Lippincott、Williams & Wilkins、Phila.、Pa.を参照されたい）。治療薬の有効量は、症状を少なくとも１０％；少なくとも２０％；少なくとも約３０％；少なくとも４０％、または少なくとも５０％減少させ得る。

【０５０６】

本発明の免疫コンジュゲートと組み合わせて投与することができる追加の療法（例えば、予防薬または治療薬）を、本発明の免疫コンジュゲートから５分未満離して、３０分未満離して、１時間離して、約１時間離して、約１～約２時間離して、約２時間～約３時間離して、約３時間～約４時間離して、約４時間～約５時間離して、約５時間～約６時間離して、約６時間～約７時間離して、約７時間～約８時間離して、約８時間～約９時間離して、約９時間～約１０時間離して、約１０時間～約１１時間離して、約１１時間～約１２時間離して、約１２時間～１８時間離して、１８時間～２４時間離して、２４時間～３６時間離して、３６時間～４８時間離して、４８時間～５２時間離して、５２時間～６０時間離して、６０時間～７２時間離して、７２時間～８４時間離して、８４時間～９６時間離して、または９６時間～１２０時間離して投与することができる。２種以上の療法を、患者の同じ１回の来院において投与することができる。

【０５０７】

ある特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートを、インビボでの適正な分布を保証するように製剤化することができる。例えば、血液脳関門（ＢＢＢ）は、多くの高親水性化合物を排除する。治療用の本発明の化合物がＢＢＢを通過することを保証するために（所望の場合には）、それらを、例えば、リポソームに製剤化することができる。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号；同第５，３７４，５４８号；および同第５，３９９，３３１号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送される１つまたは複数の部分を含み、標的化薬物送達を増強することができる（例えば、Ranade、(1989)J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。例示的な標的化部分には、フォラートまたはビオチン（例えば、Lowらに付与された米国特許第５，４１６，０１６号を参照されたい）；マンノシド（Umezawaら、(1988)Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（Bloemanら、(1995) FEBS Lett. 357:140; Owaisら、(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；サーファクタントタンパク質Ａ受容体（Briscoeら、(1995)Am. J. Physiol. 1233:134）；ｐ１２０（Schreierら、(1994)J. Biol. Chem. 269:9090）が含まれ、K. Keinanen;M. L. Laukkanen(1994)FEBS Lett. 346:123;J. J. Killion;I. J. Fidler(1994)Immunomethods 4:273も参照されたい。

【０５０８】

本発明は、本発明の免疫コンジュゲートを含む医薬組成物を単独で、または他の療法と組み合わせて、それを必要とする対象に投与するためのプロトコルを提供する。本発明の併用療法の療法（例えば、予防薬または治療薬）は、付随して、または連続して対象に投与することができる。本発明の併用療法の療法（例えば、予防薬または治療薬）は、周期的に投与することもできる。サイクリング療法は、療法（例えば、薬剤）の１種に対する耐性の発生を低減するために、療法（例えば、薬剤）の１種の副作用を回避または低減す

るために、かつ／または療法の有効性を改善するために、一時期の第１療法（例えば、第１予防薬または治療薬）の投与、続く、一時期の第２療法（例えば、第２予防薬または治療薬）の投与、およびこの連続投与の繰り返し、すなわち、サイクルを伴う。

【０５０９】

本発明の併用療法の療法（例えば、予防薬または治療薬）を対象に同時に投与することができる。

【０５１０】

用語「同時に」は、療法（例えば、予防薬または治療薬）を正確に同じ時間に投与することに限定されず、むしろ、これは、本発明の抗体が他の療法（複数可）と一緒に作用して、それらが他の方法で投与された場合よりも高い利益をもたらすような順序で、かつ時間間隔内で、本発明の抗体またはその断片を含む医薬組成物を対象に投与することを意味している。例えば、各療法を、対象に、同時に、または異なる時点で任意の順序で連続して投与することができるが；しかしながら、同時に投与しない場合には、それらを、所望の治療効果または予防効果が得られるように、時間的に十分に近接して投与すべきである。各療法を、任意の適切な形態で、かつ任意の適切な経路によって別々に、対象に投与することができる。様々な実施形態では、療法（例えば、予防薬または治療薬）を、１５分未満、３０分未満、１時間未満離して、約１時間離して、約１時間～約２時間離して、約２時間～約３時間離して、約３時間～約４時間離して、約４時間～約５時間離して、約５時間～約６時間離して、約６時間～約７時間離して、約７時間～約８時間離して、約８時間～約９時間離して、約９時間～約１０時間離して、約１０時間～約１１時間離して、約１１時間～約１２時間離して、２４時間離して、４８時間離して、７２時間離して、または１週間離して対象に投与する。他の実施形態では、２種以上の療法（例えば、予防薬または治療薬）を、患者の同じ１回の来院内で投与する。

【０５１１】

併用療法の予防薬または治療薬を対象に、同じ医薬組成物で投与することができる。別法では、併用療法の予防薬または治療薬を対象に、別々の医薬組成物で同時に投与することができる。予防薬または治療薬を対象に、同じか、または異なる投与経路によって投与することができる。

【０５１２】

本発明を十分に記載したが、本発明を、実例であって、さらなる限定を意図したものではない下記の実施例および特許請求の範囲においてさらに説明する。

【実施例１】

【０５１３】

ペプチドタグ付きＩｇＧ構築物の設計

４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ（ＰＰＴアーゼ）Ｓｆｐ（ＰＤＢ　ＩＤ：２ＧＥ１、Koglinら、(2006)Science 312:273～276）モデルのＮＭＲ構造をペプチド基質と共に外観検査することで、Ｓ６タグの反応性Ｓｅｒ残基は、酵素活性部位に深く挿入されており、補酵素Ａのαホスファートの近くに位置していることが明らかになる。ペプチド基質は、キンクにＳｅｒ残基を有するヘリックス－キンク－ループコンホメーションを採用する。これらの観察に基づき、ＩｇＧ抗体の表面上のいくつかのループを選択した。選択手順は、下記のステップを伴う。本発明者らは初めに、ヒトＩｇＧ１　Ｂ１２抗体（ＰＤＢ　ＩＤ：１ＨＺＨ、Saphireら、(2001)Science 293:1155～1159）をテンプレートとして使用して、トラスツズマブ相同性モデルを構築した。次いで、溶媒露出残基の有意な含有率を有するループを選択し、Ｓ６タグループに変換した。

【０５１４】

そのために、種々の戦略を開発した：全長ペプチドタグのグラフト、切断ペプチドタグのグラフト、および挿入（切断および全長の両方）。全長ｙｂｂＲタグのグラフトの一例は、変異抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｓ１３２Ｄ－Ｋ１３３Ｓ－Ｓ１３４Ｌ－Ｔ１３５Ｅ－Ｓ１３６Ｆ－Ｇ１３７Ｉ－Ｇ１３８Ａ－Ｔ１３９Ｓ－Ａ１４０Ｋ－Ａ１４１Ｌ－Ｌ１４２Ａ（配列番号１０２）によって例示される一方で、トラスツズマブ抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｐ１

８９Ｇ－Ｓ１９０Ｄ－Ｓ１９１－Ｓ１９２Ｌ－Ｌ１９３Ｓ－Ｇ１９４Ｗ－Ｔ１９５Ｌ（配列番号１０９）変異体は、切断Ｓ６タグのグラフトを構成している。グラフト戦略の別のバリアントを、例えば、変異抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｓ１９０Ｇ－Ｓ１９１Ｄ－Ｓ１９２－Ｌ１９３－Ｇ１９４Ｓ－Ｔ１９５Ｗ－Ｑ１９６Ｌ－Ｔ１９７Ｌ－ＲＬＬＮ－Ｙ１９８（配列番号１１３）で使用し、この際、残基Ｓ１９０およびＳ１９１を、それぞれグリシンおよびアスパラギン酸に、Ｇ１９４をセリンに、Ｔ１９５をトリプトファンに、Ｑ１９６およびＴ１９７をロイシンに変異させ、切断Ｓ６タグＲＬＬＮ（配列番号１０６０）を、Ｌ１９７およびＹ１９８の間に挿入した。別法では、切断および全長ペプチドタグの両方を、抗体残基間のループに挿入した。

【０５１５】

実施例セクションを通じて、ペプチドタグ付き抗体を、グラフトまたは挿入されたペプチドタグを含有する免疫グロブリン重鎖または軽鎖によって名付ける。簡単にするために、関連する未修飾の重鎖または軽鎖は明示しない。例えば、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）は、対応するペプチドタグ付き重鎖、ならびにＸ’$_5$＝ＡｌａおよびＸ’$_6$＝Ｖａｌを有する随伴する未修飾κ軽鎖抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ（配列番号１１３１）を含むＩｇＧ１を指す（図３を参照されたい）。対照的に、ペプチドタグ付きｍＡｂ２重鎖構築物は、未修飾のλ軽鎖ｍＡｂ２－ＬＣ（配列番号２５）に随伴している。別の実施例として、抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ－Ｓ７６Ｄ－Ｓ７７－Ｌ７８－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ７９（配列番号３０）は、Ｘ’$_1$＝Ｌｙｓ、Ｘ’$_2$＝Ｇｌｕ、Ｘ’$_3$＝Ｍｅｔ、およびＸ’$_4$＝Ａｌａを有する未修飾のＩｇγ１重鎖抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ（配列番号１１３０）に随伴するペプチドタグ付き軽鎖を含有するＩｇＧ１抗体を指す（図３を参照されたい）。ペプチドタグ（複数可）が抗体の重鎖または軽鎖の定常領域に挿入またはグラフトされている場合には、定常領域の配列のみが示されている。

【０５１６】

すべての場合において、Ｓｆｐ酵素の活性部位により深くフィットすることを可能にするために、反応性Ｓｅｒ残基がループの先端に、またはその近くに存在するように、ペプチドタグを、選択されたループ上にマッピングさせた。次に、ＩｇＧとＳｆｐ酵素との複合体を構築して、不調和について検査した。重大な不調和を有するものを退け、対応するループを、選択肢から除外した。

【０５１７】

Ｓ６およびｙｂｂＲタグ配列をトラスツズマブＩｇＧ１の定常領域の構造的ループに体系的に挿入するために、ヒトＩｇＧ１　Ｂ１２抗体（ＰＤＢ　ＩＤ：１ＨＺＨ）の結晶構造を外観検査することと、さらには、ＭｏｌＳｏｆｔ　ＬＬＣからのプログラムＩＣＭを使用することによって残基の溶媒露出表面積を計算することとの両方によって、挿入部位を選択した。

【実施例２】

【０５１８】

ペプチドタグ付きＩｇＧ構築物の生成

トラスツズマブＩｇＧ１の重鎖および軽鎖を、ＣＭＶプロモーターの制御下でｐＯＧ発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で過渡的に発現させた。標準的な分子生物学的方法によって、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼで標識するためのペプチドタグを、トラスツズマブＩｇＧ１に様々な位置で組み込んだ。クローニングのために使用するすべてのプライマーを表８に列挙する。

【０５１９】

すでに記載されているＰＥＩ方法（例えば、Erbacherら、Ｊ Gene Med.、1:210～222(1999)を参照されたい）を使用して、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞の細胞培養および形質移入を行った。簡単には、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞に、トラスツズマブ（ヒトκアイソタイプ）の重鎖および軽鎖をコードするプラスミドＤＮＡを同時形質移入した。哺乳動物細胞をＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ中、３７℃にて、５％Ｃ

O_2下で培養し、形質移入の１日前に０．７×１０^{6}細胞／ｍｌに分けた。形質移入の後に、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞を５日間培養し、その後、２０００×ｇ、４℃にて３０分間の遠心分離によって採集した。

【０５２０】

結果として生じた培地上清を０．２２μｍ細孔サイズフィルターで濾過した。次いで、濾液を約１ｍＬ／分の流速で、ＰＢＳ２０カラム体積で予め平衡化させておいたタンパク質Ａアフィニティーカラムに負荷した。カラムをＰＢＳ２０カラム体積で洗浄した後に、抗体を０．１Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ３．０）５カラム体積で溶離した。溶離液をすぐに、１Ｍトリス／ＨＣｌ（ｐＨ１０）１０％（ｖ／ｖ）で中和した。３．５または７．０ｋＤａ分子量カットオフのＳｌｉｄｅ－ａ－Ｌｙｚｅｒ透析カセット（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用して、ＰＢＳへの透析を行った。

【０５２１】

最終生成物の純度を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価した。タンパク質収量を、ブラッドフォード法か、またはＮＤ－１０００　ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計を使用する２８０ｎｍでの紫外線分光法かのいずれかによって決定した。ペプチドタグ付きトラスツズマブＩｇＧのタンパク質収量を表９に列挙する。

【０５２２】

【表８－１】

表8. 組換えPPTアーゼ酵素およびその変異体ならびに挿入/グラフトされたペプチドタグを有するトラスツズマブIgG(HC、重鎖;LC、軽鎖)を構築するために使用されたプライマーのDNA配列

配列名	配列番号	配列	配列番号
抗-hHER2-HC-A118-GDSLSWLLRLLN-S119	150	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCAAGGGCCCCAGCG	1061
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAGCCGAGGAGACGGTGACCAG	1062
抗-hHER2-HC-S119-GDSLSWLLRLLN-T120	151	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC	1063
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTAGCCGAGGAGACGGTGAC	1064
抗-hHER2-HC-T120-GDSLSWLLRLLN-K121	152	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGGCCCCAGCGTGTTCCC	1065
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCTAGCCGAGGAGACGG	1066
抗-hHER2-HC-S131-GDSLSWLLRLLN-S132	153	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAAGAGCACCAGCGGCGG	1067
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGGAAC	1068
抗-hHER2-HC-S132-GDSLSWLLRLLN-K133	154	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAGCACCAGCGGCGGCAC	1069
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGGGCCAGGGG	1070
抗-hHER2-HC-K133-GDSLSWLLRLLN-S134	155	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCAGCGGCGGCACAG	1071
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	1072
抗-hHER2-HC-S134-GDSLSWLLRLLN-T135	156	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAGCGGCGGCACAGCC	1073
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	1074
抗-hHER2-HC-T135-GDSLSWLLRLLN-S136	157	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCGGCACAGCCGCC	1075
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCTCTTGCTGCTGGGGG	1076
抗-hHER2-HC-S136-GDSLSWLLRLLN-G137	158	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGGCACAGCCGCCCTG	1077
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGCTGGG	1078
抗-hHER2-HC-G137-GDSLSWLLRLLN-G138	159	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCACAGCCGCCCTGGGC	1079
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGC	1080
抗-hHER2-HC-G138-GDSLSWLLRLLN-T139	160	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACAGCCGCCCTGGGCTGC	1081
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGCCGCTGGTGCTCTTG	1082
抗-hHER2-HC-E152-GDSLSWLLRLLN-P153	161	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGTGACCGTGTCCTGGAAC	1083
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGGAAGTAGTCCTTCACC	1084
抗-hHER2-HC-P153-GDSLSWLLRLLN-V154	162	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGACCGTGTCCTGGAACAGCG	1085
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTCGGGGAAGTAGTCCTTC	1086
抗-hHER2-HC-N159-GDSLSWLLRLLN-S160	163	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG	1087
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCCAGGACACGGTCACGGG	1088
抗-hHER2-HC-S160-GDSLSWLLRLLN-G161	164	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC	1089
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGTTCCAGGACACGGTCACG	1090
抗-hHER2-HC-G161-GDSLSWLLRLLN-A162	165	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGACCTCCGGCGTG	1091
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTCCGCTGTTCCAGGACACGG	1092

【表８－２】

抗-hHER2-HC-A162-GDSLSWLLRLLN-L163	166	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGACCTCCGGCGTGCACAC	1093
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTCCGCTGTTCCAGGACAC	1094
抗-hHER2-HC-L163-GDSLSWLLRLLN-T164	167	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCTCCGGCGTGCACACCTTC	389
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCTCCGCTGTTCCAGG	390
抗-hHER2-HC-T164-GDSLSWLLRLLN-S165	168	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCGGCGTGCACACCTTCCC	391
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCAGGGCTCCGCTGTTCC	392
抗-hHER2-HC-S165-GDSLSWLLRLLN-G166	169	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGTGCACACCTTCCCCG	393
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGAGGTCAGGGCTCCGCTG	394
抗-hHER2-HC-P171-GDSLSWLLRLLN-A172	170	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGTGCTGCAGAGCAGCG	395
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAAGGTGTGCACGCCG	396
抗-hHER2-HC-S176-GDSLSWLLRLLN-S177	171	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCCTGTACAGCCTGTCC	397
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTGCAGCACGGCGGG	398
抗-hHER2-HC-S177-GDSLSWLLRLLN-G178	172	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCTGTACAGCCTGTCCAGC	399
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTCTGCAGCACGGCG	400
抗-hHER2-HC-P189-GDSLSWLLRLLN-S190	173	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGCAGCCTGGGCACCC	401
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCACTGTCACCACGCTGG	402
抗-hHER2-HC-S190-GDSLSWLLRLLN-S191	174	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGCCTGGGCACCCAGAC	403
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGCACTGTCACCACGC	404
抗-hHER2-HC-S191-GDSLSWLLRLLN-S192	175	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCCTGGGCACCCAGACCTAC	405
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGCACTGTCACCAC	406
抗-hHER2-HC-S192-GDSLSWLLRLLN-L193	176	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGGGCACCCAGACCTACATC	407
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTCAC	408
抗-hHER2-HC-L193-GDSLSWLLRLLN-G194	177	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCACCCAGACCTACATCTGC	409
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCTGCTGCTGGGCACTG	410
抗-hHER2-HC-G194-GDSLSWLLRLLN-T195	178	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCCAGACCTACATCTGCAACGTG	411
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCAGGCTGCTGCTGGG	412
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	110	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	413
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCCCAGGCTGCTGCTG	414
抗-hHER2-HC-Q196-GDSLSWLLRLLN-T197	180	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCTACATCTGCAACGTGAACCAC	415
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGGTGCCCAGGCTGCTG	416
抗-hHER2-HC-K205-GDSLSWLLRLLN-P206	181	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAGCAACACCAAGGTGGAC	417
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGTGGTTCACGTTGCAGATGTAG G	418
抗-hHER2-HC-P206-GDSLSWLLRLLN-S207	182	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA G	419
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTTGTGGTTCACGTTGCAG	420
抗-hHER2-HC-S207-GDSLSWLLRLLN-N208	183	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTG G	421
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGCTTGTGGTTCACGTTG	422
抗-hHER2-HC-P230-GDSLSWLLRLLN-A231	184	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCCAGAGCTGCTGGGC	423
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGCAGGGGGGGCAGGTG	424
抗-hHER2-HC-A231-GDSLSWLLRLLN-P232	185	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGAGCTGCTGGGCGGAC	425
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTGGGCAGGGGGGGC	426

【表８－３】

抗-hHER2-HC-P232-GDSLSWLLRLLN-E233	186	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCTGCTGGGCGGACCC	427
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGGCTGGGCAGGGGGG	428
抗-hHER2-HC-E233-GDSLSWLLRLLN-L234	187	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCTGGGCGGACCCTCC	429
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCTGGGGCTGGGCAGGG	430
抗-hHER2-HC-L234-GDSLSWLLRLLN-L235	188	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGGGCGGACCCTCCGTG	431
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCTCTGGGGCTGGGCAG	432
抗-hHER2-HC-L235-GDSLSWLLRLLN-G236	189	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGGACCCTCCGTGTTCC	433
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCAGCTCTGGGGCTGGG	434
抗-hHER2-HC-G236-GDSLSWLLRLLN-G237	190	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCC	435
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCAGCAGCTCTGGGGC	436
抗-hHER2-HC-P244-GDSLSWLLRLLN-P245	191	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAAGCCCAAGGACACCCTG	437
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAACAGGAACACGGAGGG	438
抗-hHER2-HC-P245-GDSLSWLLRLLN-K246	192	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC	439
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGGGAACAGGAACACGG	440
抗-hHER2-HC-I253-GDSLSWLLRLLN-S254	193	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGGACCCCCGAGGTGAC	441
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGATCATCAGGGTGTCCTTGGGC	442
抗-hHER2-HC-S254-GDSLSWLLRLLN-R255	194	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGGACCCCCGAGGTGACCTG	443
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGATCATCAGGGTGTCCTTGG	444
抗-hHER2-HC-R255-GDSLSWLLRLLN-T256	195	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCCCCGAGGTGACCTGCG	445
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCTGCTGATCATCAGGGTGTCC	446
抗-hHER2-HC-T256-GDSLSWLLRLLN-P257	196	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGAGGTGACCTGCGTGG	447
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCCTGCTGATCATCAGGGTG	448
抗-hHER2-HC-P257-GDSLSWLLRLLN-E258	197	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG	449
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGTCCTGCTGATCATCAG	450
抗-hHER2-HC-S267-GDSLSWLLRLLN-H268	198	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC	451
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCACGTCCACCACCACGC	452
抗-hHER2-HC-H268-GDSLSWLLRLLN-E269	199	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC	453
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGGCTCACGTCCACCACCAC	454
抗-hHER2-HC-E269-GDSLSWLLRLLN-D270	200	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG	455
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGTGGCTCACGTCCACCAC	456
抗-hHER2-HC-D270-GDSLSWLLRLLN-P271	201	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC	457
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCTCGTGGCTCACGTCCAC	458
抗-hHER2-HC-P271-GDSLSWLLRLLN-E272	202	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG G	459
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGTCCTCGTGGCTCACGTC	460
抗-hHER2-HC-D280-GDSLSWLLRLLN-G281	203	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGTGGAGGTGCACAACGC	461
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCACGTACCAGTTGAACTTCACC	462
抗-hHER2-HC-H285-GDSLSWLLRLLN-N286	204	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG	463
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCACCTCCACGCCGTCC	464
抗-hHER2-HC-N286-GDSLSWLLRLLN-A287	205	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG	465
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTGCACCTCCACGCCGTC	466
抗-hHER2-HC-P291-GDSLSWLLRLLN-R292	206	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC	467
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTTGGTCTTGGCGTTGTG	468

【表８－４】

抗-hHER2-HC-T307-GDSLSWLLRLLN-V308	207	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGCTGCACCAGGACTGGCTG	469
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCAGCACGGACACCACCC	470
抗-hHER2-HC-V308-GDSLSWLLRLLN-L309	208	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCACCAGGACTGGCTGAAC	471
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACGGTCAGCACGGACACCAC	472
抗-hHER2-HC-L309-GDSLSWLLRLLN-H310	209	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACCAGGACTGGCTGAACGGC	473
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCACGGTCAGCACGGACAC	474
抗-hHER2-HC-H310-GDSLSWLLRLLN-Q311	210	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG	475
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCAGCACGGTCAGCACGG	476
抗-hHER2-HC-N315-GDSLSWLLRLLN-G316	211	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC	477
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTGCAG	478
抗-hHER2-HC-G316-GDSLSWLLRLLN-K317	212	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCA AC	479
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTG	480
抗-hHER2-HC-K317-GDSLSWLLRLLN-E318	213	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AG	481
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCCGTTCAGCCAGTCCTG	482
抗-hHER2-HC-K326-GDSLSWLLRLLN-A327	214	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGCCAGCCCCCATC	483
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGTTGGAGACCTTGCACTTGTATT C	484
抗-hHER2-HC-A327-GDSLSWLLRLLN-L328	215	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCCAGCCCCCATCGAAAAG	485
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCTTGTTGGAGACCTTGCAC	486
抗-hHER2-HC-L328-GDSLSWLLRLLN-P329	216	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGCCCCCATCGAAAAGACC	487
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCCTTGTTGGAGACCTTG	488
抗-hHER2-HC-P329-GDSLSWLLRLLN-A330	217	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCCCATCGAAAAGACCATCAG	489
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGCAGGGCCTTGTTGGAGAC	490
抗-hHER2-HC-A330-GDSLSWLLRLLN-P331	218	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAG	491
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTGGCAGGGCCTTGTTGG	492
抗-hHER2-HC-A339-GDSLSWLLRLLN-K340	219	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGGCCAGCCACGGGAGC	493
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCTTGCTGATGGTCTTTTCGATG	494
抗-hHER2-HC-K340-GDSLSWLLRLLN-G341	220	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCAGCCACGGGAGCCC	495
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTCTTTTC	496
抗-hHER2-HC-G341-GDSLSWLLRLLN-Q342	221	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCCACGGGAGCCCCAG	497
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTC	498
抗-hHER2-HC-Q342-GDSLSWLLRLLN-P343	222	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCACGGGAGCCCCAGGTG	499
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGCCCTTGGCCTTGCTGATG	500
抗-hHER2-HC-P343-GDSLSWLLRLLN-R344	223	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCGGGAGCCCCAGGTGTACAC	501
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGCTGGCCCTTGGCCTTGC	502
抗-hHER2-HC-R344-GDSLSWLLRLLN-E345	224	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCCCCAGGTGTACACCCTG	503
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGTGGCTGGCCCTTGGC	504
抗-hHER2-HC-R355-GDSLSWLLRLLN-E356	225	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG	505
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGGGAGGGGGGCAGGG	506
抗-hHER2-HC-E356-GDSLSWLLRLLN-E357	226	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC	507
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGAGGGGGGCAG	508
抗-hHER2-HC-E357-	227	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG	509

【表８－５】

GDSLSWLLRLLN-M358		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCTCCCGGGAGGGGGG	510
抗-hHER2-HC-M358-GDSLSWLLRLLN-T359	228	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC	511
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	512
抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	121	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG	513
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCATCTCCTCCCGGGAGG	514
抗-hHER2-HC-K360-GDSLSWLLRLLN-N361	229	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC	515
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGTCATCTCCTCCCGGGAG	516
抗-hHER2-HC-N384-GDSLSWLLRLLN-G385	230	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCAGCCCGAGAACAACTAC	517
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGCTCTCCCACTCCACGGC	518
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	127	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	519
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	520
抗-hHER2-HC-N389-GDSLSWLLRLLN-N390	231	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAGTGC	521
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCTCGGGCTGGCCGTTGC	522
抗-hHER2-HC-T394-GDSLSWLLRLLN-P395	232	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCTCCAGTGCTGGACAGCGAC	523
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCGGGC	524
抗-hHER2-HC-P395-GDSLSWLLRLLN-P396	233	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGTGCTGGACAGCGACGG	525
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAGGTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCG	526
抗-hHER2-HC-D399-GDSLSWLLRLLN-S400	234	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG	527
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCAGCACTGGAGGTGTGGTC	528
抗-hHER2-HC-S400-GDSLSWLLRLLN-D401	136	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG	529
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGTCCAGCACTGGAGGTGTG	530
抗-hHER2-HC-D401-GDSLSWLLRLLN-G402	235	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG	531
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCGCTGTCCAGCACTGGAGG	532
抗-hHER2-HC-S415-GDSLSWLLRLLN-R416	236	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGGTGGCAGCAGGGCAACGTG	533
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACTTGTCCACGGTCAGCTTG	534
抗-hHER2-HC-R416-GDSLSWLLRLLN-W417	237	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC	535
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCTGGACTTGTCCACGGTCAG	536
抗-hHER2-HC-W417-GDSLSWLLRLLN-Q418	238	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC	537
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCACCTGGACTTGTCCACGGTC	538
抗-hHER2-HC-Q418-GDSLSWLLRLLN-Q419	239	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC	539
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCCACCTGGACTTGTCCAC	540
抗-hHER2-HC-Q419-GDSLSWLLRLLN-G420	240	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC	541
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTGCCACCTGGACTTGTC	542
抗-hHER2-HC-G420-GDSLSWLLRLLN-N421	241	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG	543
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTGCTGCCACCTGGAC	544
抗-hHER2-HC-N421-GDSLSWLLRLLN-V422	242	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC	545
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGCCCTGCTGCCACCTGG	546
抗-hHER2-HC-H433-GDSLSWLLRLLN-N434	243	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTG	547
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCAGGGCCTCGTGCATCAC	548
抗-hHER2-HC-N434-GDSLSWLLRLLN-H435	244	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAG	549
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTGCAGGGCCTCGTGCATC	550
抗-hHER2-HC-S442-GDSLSWLLRLLN-L443	245	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGTCCCCCGGCAAGTAATCTAG	551
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCAGGCTCTTCTGGGTGTAG	552

【表８－６】

抗-hHER2-HC-L443-GDSLSWLLRLLN-S444	246	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCCCCGGCAAGTAATCTAGACAC	553
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCTCAGGCTCTTCTGGGTG	554
抗-hHER2-HC-S444-GDSLSWLLRLLN-P445	247	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGGCAAGTAATCTAGACACCTC	555
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACAGGCTCAGGCTCTTCTG	556
抗-hHER2-HC-P445-GDSLSWLLRLLN-G446	248	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAAGTAATCTAGACACCTCAGAC	557
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGACAGGCTCAGGCTC	558
抗-hHER2-HC-G446-GDSLSWLLRLLN-K447	139	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGTAATCTAGACACCTCAGACAATCAAC	559
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGGGGGACAGGCTCAG	560
抗-hHER2-HC-A118-DSLEFIASKLA-S119	249	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCG	561
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAGCCGAGGAGACGGTGACCAG	562
抗-hHER2-HC-S119-DSLEFIASKLA-T120	250	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC	563
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTAGCCGAGGAGACGGTGAC	564
抗-hHER2-HC-T120-DSLEFIASKLA-K121	251	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCC	565
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCTAGCCGAGGAGACGG	566
抗-hHER2-HC-S131-DSLEFIASKLA-S132	252	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG	567
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGCCAGGGGGAAC	568
抗-hHER2-HC-S132-DSLEFIASKLA-K133	253	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC	569
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGGGGGCCAGGGG	570
抗-hHER2-HC-K133-DSLEFIASKLA-S134	254	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCAGCGGCGGCACAG	571
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	572
抗-hHER2-HC-S134-DSLEFIASKLA-T135	255	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAGCGGCGGCACAGCC	573
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	574
抗-hHER2-HC-T135-DSLEFIASKLA-S136	256	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGGCACAGCCGCC	575
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCTCTTGCTGCTGGGGG	576
抗-hHER2-HC-S136-DSLEFIASKLA-137	257	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGGCACAGCCGCCCTG	577
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGTGCTCTTGCTGCTGGG	578
抗-hHER2-HC-G137-DSLEFIASKLA-G138	258	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCACAGCCGCCCTGGGC	579
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGC	580
抗-hHER2-HC-G138-DSLEFIASKLA-T139	259	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACAGCCGCCCTGGGCTGC	581
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGCCGCTGGTGCTCTTG	582
抗-hHER2-HC-E152-DSLEFIASKLA-P153	260	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGTGACCGTGTCCTGGAAC	583
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGGAAGTAGTCCTTCACC	584
抗-hHER2-HC-P153-DSLEFIASKLA-V154	261	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCG	585
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTCGGGGAAGTAGTCCTTC	586
抗-hHER2-HC-N159-DSLEFIASKLA-S160	262	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGAGCCCTGACCTCCG	587
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCCAGGACACGGTCACGGG	588
抗-hHER2-HC-S160-DSLEFIASKLA-G161	263	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC	589
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGTTCCAGGACACGGTCACG	590
抗-hHER2-HC-G161-DSLEFIASKLA-A162	264	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGACCTCCGGCGTG	591
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCCGCTGTTCCAGGACACGG	592
抗-hHER2-HC-A162-DSLEFIASKLA-L163	265	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGACCTCCGGCGTGCACAC	593
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTCCGCTGTTCCAGGACAC	594

【表８－７】

抗-hHER2-HC-L163-DSLEFIASKLA-T164	266	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCTCCGGCGTGCACACCTTC	595
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCTCCGCTGTTCCAGG	596
抗-hHER2-HC-T164-DSLEFIASKLA-S165	267	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCACACCTTCCC	597
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCAGGGCTCCGCTGTTCC	598
抗-hHER2-HC-S165-DSLEFIASKLA-G166	268	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGTGCACACCTTCCCCG	599
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGAGGTCAGGGCTCCGCTG	600
抗-hHER2-HC-P171-DSLEFIASKLA-A172	269	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCG	601
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAAGGTGTGCACGCCG	602
抗-hHER2-HC-S176-DSLEFIASKLA-S177	270	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCC	603
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTGCAGCACGGCGGG	604
抗-hHER2-HC-S177-DSLEFIASKLA-G178	271	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGC	605
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTCTGCAGCACGGCG	606
抗-hHER2-HC-P189-DSLEFIASKLA-S190	272	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCC	607
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTGG	608
抗-hHER2-HC-S190-DSLEFIASKLA-S191	273	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC	609
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCACTGTCACCACGC	610
抗-hHER2-HC-S191-DSLEFIASKLA-S192	274	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC	611
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGGGCACTGTCACCAC	612
抗-hHER2-HC-S192-DSLEFIASKLA-L193	275	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGGGCACCCAGACCTACATC	613
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGCTGGGCACTGTCAC	614
抗-hHER2-HC-L193-DSLEFIASKLA-G194	276	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCACCCAGACCTACATCTGC	615
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCTGCTGCTGGGCACTG	616
抗-hHER2-HC-G194-DSLEFIASKLA-T195	277	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG	617
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCAGGCTGCTGCTGGG	618
抗-hHER2-HC-T195-DSLEFIASKLA-Q196	278	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	619
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCCCAGGCTGCTGCTG	620
抗-hHER2-HC-Q196-DSLEFIASKLA-T197	279	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCTACATCTGCAACGTGAACCAC	621
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGGTGCCCAGGCTGCTG	622
抗-hHER2-HC-K205-DSLEFIASKLA-P206	280	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAGCAACACCAAGGTGGAC	623
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGTGGTTCACGTTGCAGATGTAGG	624
抗-hHER2-HC-P206-DSLEFIASKLA-S207	281	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG	625
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTTGTGGTTCACGTTGCAG	626
抗-hHER2-HC-S207-DSLEFIASKLA-N208	282	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGG	627
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCTTGTGGTTCACGTTG	628
抗-hHER2-HC-P230-DSLEFIASKLA-A231	283	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCCAGAGCTGCTGGGC	629
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGCAGGGGGGGCAGGTG	630
抗-hHER2-HC-A231-DSLEFIASKLA-P232	284	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC	631
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTGGGCAGGGGGGGC	632
抗-hHER2-HC-P232-DSLEFIASKLA-E233	285	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCTGCTGGGCGGACCC	633
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGGCTGGGCAGGGGGG	634
抗-hHER2-HC-E233-	286	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCTGGGCGGACCCTCC	635

【表８－８】

DSLEFIASKLA-L234		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCTGGGGCTGGGCAGGG	636
抗-hHER2-HC-L234-DSLEFIASKLA-L235	287	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGGGCGGACCCTCCGTG	637
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCTCTGGGGCTGGGCAG	638
抗-hHER2-HC-L235-DSLEFIASKLA-G236	288	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCC	639
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCAGCTCTGGGGCTGGG	640
抗-hHER2-HC-G236-DSLEFIASKLA-G237	289	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCC	641
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCAGCAGCTCTGGGGC	642
抗-hHER2-HC-P244-DSLEFIASKLA-P245	290	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG	643
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAACAGGAACACGGAGGG	644
抗-hHER2-HC-P245-DSLEFIASKLA-K246	291	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC	645
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGGGAACAGGAACACGG	646
抗-hHER2-HC-I253-DSLEFIASKLA-S254	292	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC	647
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATCATCAGGGTGTCCTTGGGC	648
抗-hHER2-HC-S254-DSLEFIASKLA-R255	293	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGGACCCCCGAGGTGACCTG	649
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGATCATCAGGGTGTCCTTGG	650
抗-hHER2-HC-R255-DSLEFIASKLA-T256	294	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCCCCGAGGTGACCTGCG	651
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCTGCTGATCATCAGGGTGTCC	652
抗-hHER2-HC-T256-DSLEFIASKLA-P257	295	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGAGGTGACCTGCGTGG	653
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCCTGCTGATCATCAGGGTG	654
抗-hHER2-HC-P257-DSLEFIASKLA-E258	296	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG	655
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGTCCTGCTGATCATCAG	656
抗-hHER2-HC-S267-DSLEFIASKLA-H268	297	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC	657
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCACGTCCACCACCACGC	658
抗-hHER2-HC-H268-DSLEFIASKLA-E269	298	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC	659
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGGCTCACGTCCACCACCAC	660
抗-hHER2-HC-E269-DSLEFIASKLA-D270	299	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG	661
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGTGGCTCACGTCCACCAC	662
抗-hHER2-HC-D270-DSLEFIASKLA-P271	300	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC	663
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCTCGTGGCTCACGTCCAC	664
抗-hHER2-HC-P271-DSLEFIASKLA-E272	301	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG	665
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGTCCTCGTGGCTCACGTC	666
抗-hHER2-HC-D280-DSLEFIASKLA-G281	302	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGTGGAGGTGCACAACGC	667
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCACGTACCAGTTGAACTTCACC	668
抗-hHER2-HC-H285-DSLEFIASKLA-N286	303	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG	669
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCACCTCCACGCCGTCC	670
抗-hHER2-HC-N286-DSLEFIASKLA-A287	304	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG	671
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTGCACCTCCACGCCGTC	672
抗-hHER2-HC-P291-DSLEFIASKLA-R292	305	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC	673
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTTGGTCTTGGCGTTGTG	674
抗-hHER2-HC-T307-DSLEFIASKLA-V308	306	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG	675
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCAGCACGGACACCACCC	676
抗-hHER2-HC-V308-DSLEFIASKLA-L309	307	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC	677
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACGGTCAGCACGGACACCAC	678

【表８－９】

抗-hHER2-HC-L309-DSLEFIASKLA-H310	308	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACCAGGACTGGCTGAACGGC	679
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCACGGTCAGCACGGACAC	680
抗-hHER2-HC-H310-DSLEFIASKLA-Q311	309	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGACTGGCTGAACGGCAAG	681
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCAGCACGGTCAGCACGG	682
抗-hHER2-HC-N315-DSLEFIASKLA-G316	310	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC	683
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCAGCCAGTCCTGGTGCAG	684
抗-hHER2-HC-G316-DSLEFIASKLA-K317	311	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC	685
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTG	686
抗-hHER2-HC-K317-DSLEFIASKLA-E318	312	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG	687
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCCGTTCAGCCAGTCCTG	688
抗-hHER2-HC-K326-DSLEFIASKLA-A327	313	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGCCAGCCCCCATC	689
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGTTGGAGACCTTGCACTTGTATTC	690
抗-hHER2-HC-A327-DSLEFIASKLA-L328	314	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAG	691
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCTTGTTGGAGACCTTGCAC	692
抗-hHER2-HC-L328-DSLEFIASKLA P329	315	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGCCCCCATCGAAAAGACC	693
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCCTTGTTGGAGACCTTG	694
抗-hHER2-HC-P329-DSLEFIASKLA-A330	316	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCCCATCGAAAAGACCATCAG	695
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCAGGGCCTTGTTGGAGAC	696
抗-hHER2-HC-A330-DSLEFIASKLA-P331	317	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAG	697
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTGGCAGGGCCTTGTTGG	698
抗-hHER2-HC-A339-DSLEFIASKLA-K340	318	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC	699
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCTTGCTGATGGTCTTTTCGATG	700
抗-hHER2-HC-K340-DSLEFIASKLA-G341	319	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCAGCCACGGGAGCCC	701
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGCCTTGCTGATGGTCTTTTC	702
抗-hHER2-HC-G341-DSLEFIASKLA-Q342	320	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCCACGGGAGCCCCAG	703
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTC	704
抗-hHER2-HC-Q342-DSLEFIASKLA-P343	321	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCACGGGAGCCCCAGGTG	705
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGCCCTTGGCCTTGCTGATG	706
抗-hHER2-HC-P343-DSLEFIASKLA-R344	322	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCGGGAGCCCCAGGTGTACAC	707
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCTGGCCCTTGGCCTTGC	708
抗-hHER2-HC-R344-DSLEFIASKLA-E345	323	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCCCCAGGTGTACACCCTG	709
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGTGGCTGGCCCTTGGC	710
抗-hHER2-HC-R355-DSLEFIASKLA-E356	324	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG	711
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGGGAGGGGGGCAGGG	712
抗-hHER2-HC-E356-DSLEFIASKLA-E357	325	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC	713
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCCGGGAGGGGGGCAG	714
抗-hHER2-HC-E357-DSLEFIASKLA-M358	326	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG	715
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCTCCCGGGAGGGGGG	716
抗-hHER2-HC-M358-DSLEFIASKLA-T359	327	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC	717
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	718
抗-hHER2-HC-T359-	122	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG	719

【表８－１０】

DSLEFIASKLA-K360		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCATCTCCTCCCGGGAGG	720
抗-hHER2-HC-K360-DSLEFIASKLA-N361	328	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC	721
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGTCATCTCCTCCCGGGAG	722
抗-hHER2-HC-N384-DSLEFIASKLA-G385	329	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCAGCCCGAGAACAACTAC	723
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGCTCTCCCACTCCACGGC	724
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	129	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	725
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	726
抗-hHER2-HC-N389-DSLEFIASKLA-N390	330	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACTACAAGACCACACCTCCAGTGC	727
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCTCGGGCTGGCCGTTGC	728
抗-hHER2-HC-T394-DSLEFIASKLA-P395	331	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCTCCAGTGCTGGACAGCGAC	729
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCGGGC	730
抗-hHER2-HC-P395-DSLEFIASKLA-P396	332	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGTGCTGGACAGCGACGG	731
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAGGTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCG	732
抗-hHER2-HC-D399-DSLEFIASKLA-S400	333	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG	733
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCAGCACTGGAGGTGTGGTC	734
抗-hHER2-HC-S400-DSLEFIASKLA-D401	334	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG	735
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGTCCAGCACTGGAGGTGTG	736
抗-hHER2-HC-D401-DSLEFIASKLA-G402	335	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG	737
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCGCTGTCCAGCACTGGAGG	738
抗-hHER2-HC-S415-DSLEFIASKLA-R416	336	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTG	739
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACTTGTCCACGGTCAGCTTG	740
抗-hHER2-HC-R416-DSLEFIASKLA-W417	337	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC	741
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCTGGACTTGTCCACGGTCAG	742
抗-hHER2-HC-W417-DSLEFIASKLA-Q418	338	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC	743
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCACCTGGACTTGTCCACGGTC	744
抗-hHER2-HC-Q418-DSLEFIASKLA-Q419	339	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC	745
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCCACCTGGACTTGTCCAC	746
抗-hHER2-HC-Q419-DSLEFIASKLA-G420	340	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC	747
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCTGCCACCTGGACTTGTC	748
抗-hHER2-HC-G420-DSLEFIASKLA-N421	341	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG	749
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTGCTGCCACCTGGAC	750
抗-hHER2-HC-N421-DSLEFIASKLA-V422	342	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC	751
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGCCCTGCTGCCACCTGG	752
抗-hHER2-HC-H433-DSLEFIASKLA-N434	343	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACCACTACACCCAGAAGAGCCTG	753
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCAGGGCCTCGTGCATCAC	754
抗-hHER2-HC-N434-DSLEFIASKLA-H435	344	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACTACACCCAGAAGAGCCTGAG	755
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTGCAGGGCCTCGTGCATC	756
抗-hHER2-HC-S442-DSLEFIASKLA-L443	345	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGTCCCCCGGCAAGTAATCTAG	757
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCAGGCTCTTCTGGGTGTAG	758
抗-hHER2-HC-L443-DSLEFIASKLA-S444	346	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCCCCGGCAAGTAATCTAGACAC	759
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCTCAGGCTCTTCTGGGTG	760
抗-hHER2-HC-S444-DSLEFIASKLA-P445	347	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGGCAAGTAATCTAGACACCTC	761
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACAGGCTCAGGCTCTTCTG	762

【表８－１１】

抗-hHER2-HC-P445-DSLEFIASKLA-G446	348	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAAGTAATCTAGACACCTCAGAC	763
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGACAGGCTCAGGCTC	764
抗-hHER2-HC-G446-DSLEFIASKLA-K447	349	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGTAATCTAGACACCTCAGACAATCAAC	765
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGGGGGACAGGCTCAG	766
抗-hHER2-LC-T109-GDSLSWLLRLLN-V110	31	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGGCCGCTCCCAGCGTG	767
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGT	768
抗-hHER2-LC-V110-GDSLSWLLRLLN-A111	32	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGCTCCCAGCGTGTTCATC	769
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACCGTTCGTTTGATCTCCACCTTG	770
抗-hHER2-LC-A111-GDSLSWLLRLLN-A112	33	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC	771
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCACCGTTCGTTTGATCTCC	772
抗-hHER2-LC-P119-GDSLSWLLRLLN-P120	34	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG	773
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAAGATGAACACGCTGGG	774
抗-hHER2-LC-P120-GDSLSWLLRLLN-S121	35	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC	775
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGGGAAGATGAACACGCTG	776
抗-hHER2-LC-S121-GDSLSWLLRLLN-D122	36	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC	777
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGGGAAGATGAACAC	778
抗-hHER2-LC-D122-GDSLSWLLRLLN-E123	37	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC	779
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCGCTGGGGGGGAAGATGAAC	780
抗-hHER2-LC-Y140-GDSLSWLLRLLN-P141	38	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCCGGGAGGCCAAGGTG	781
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTAGAAGTTGTTCAGCAGGCACAC	782
抗-hHER2-LC-P141-GDSLSWLLRLLN-R142	39	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG	783
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGTAGAAGTTGTTCAGCAGGC	784
抗-hHER2-LC-R142-GDSLSWLLRLLN-E143	40	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG	785
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGGGGGTAGAAGTTGTTCAGC	786
抗-hHER2-LC-E143-GDSLSWLLRLLN-A144	41	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG	787
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTC	788
抗-hHER2-LC-D151-GDSLSWLLRLLN-N152	42	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC	789
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCACCTTCCACTGCACCTTG	790
抗-hHER2-LC-N152-GDSLSWLLRLLN-A153	43	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG	791
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTCCACCTTCCACTGCACC	792
抗-hHER2-LC-A153-GDSLSWLLRLLN-L154	44	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG	793
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCGTTGTCCACCTTCCACTG	794
抗-hHER2-LC-L154-GDSLSWLLRLLN-Q155	45	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGAGCGGCAACAGCCAGGAG	795
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCGTTGTCCACCTTCCAC	796
抗-hHER2-LC-Q155-GDSLSWLLRLLN-S156	46	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC	797
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCAGGGCGTTGTCCACCTTC	798
抗-hHER2-LC-E161-GDSLSWLLRLLN-S162	47	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGTCACCGAGCAGGACAGC	799
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCTGGCTGTTGCCGCTCTG	800
抗-hHER2-LC-S162-GDSLSWLLRLLN-V163	48	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTCACCGAGCAGGACAGCAAG	801
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTCCTGGCTGTTGCCGC	802
抗-hHER2-LC-V163-GDSLSWLLRLLN-T164	49	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCGAGCAGGACAGCAAGGAC	803
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGACGCTCTCCTGGCTGTTGCC	804

【表８－１２】

抗-hHER2-LC-T164-GDSLSWLLRLLN-E165	50	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCAGGACAGCAAGGACTCC	805
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGACGCTCTCCTGGCTGTTG	806
抗-hHER2-LC-E165-GDSLSWLLRLLN-Q166	51	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGACAGCAAGGACTCCACC	807
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGTGACGCTCTCCTGGC	808
抗-hHER2-LC-Q166-GDSLSWLLRLLN-D167	52	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACAGCAAGGACTCCACCTACAG	809
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTCGGTGACGCTCTCCTG	810
抗-hHER2-LC-D167-GDSLSWLLRLLN-S168	53	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC	811
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCTGCTCGGTGACGCTCTC	812
抗-hHER2-LC-T197-GDSLSWLLRLLN-H198	54	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACCAGGGCCTGTCCAGCC	813
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCACCTCGCAGGCGTACAC	814
抗-hHER2-LC-H198-GDSLSWLLRLLN-Q199	55	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGGCCTGTCCAGCCCC	815
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGGGTCACCTCGCAGGCG	816
抗-hHER2-LC-Q199-GDSLSWLLRLLN-G200	56	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCTGTCCAGCCCCGTG	817
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGTGGGTCACCTCGCAGG	818
抗-hHER2-LC-G200-GDSLSWLLRLLN-L201	57	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG	819
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTGGTGGGTCACCTCG	820
抗-hHER2-LC-L201-GDSLSWLLRLLN-S202	58	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC	821
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCCCTGGTGGGTCACC	822
抗-hHER2-LC-S202-GDSLSWLLRLLN-S203	59	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC	823
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACAGGCCCTGGTGGGTC	824
抗-hHER2-LC-S203-GDSLSWLLRLLN-P204	60	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAG	825
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGACAGGCCCTGGTGG	826
抗-hHER2-LC-K207-GDSLSWLLRLLN-S208	61	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC	827
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGTCACGGGGCTGGACAG	828
抗-hHER2-LC-T109-DSLEFIASKLA-V110	62	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGGCCGCTCCCAGCGTG	829
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGT	830
抗-hHER2-LC-V110-DSLEFIASKLA-A111	63	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCGCTCCCAGCGTGTTCATC	831
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACCGTTCGTTTGATCTCCACCTTG	832
抗-hHER2-LC-A111-DSLEFIASKLA-A112	64	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC	833
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCACCGTTCGTTTGATCTCC	834
抗-hHER2-LC-P119-DSLEFIASKLA-P120	65	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG	835
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAAGATGAACACGCTGGG	836
抗-hHER2-LC-P120-DSLEFIASKLA-S121	66	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC	837
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGGGAAGATGAACACGCTG	838
抗-hHER2-LC-S121-DSLEFIASKLA-D122	67	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC	839
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGGGAAGATGAACAC	840
抗-hHER2-LC-D122-DSLEFIASKLA-E123	68	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC	841
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCGCTGGGGGGGAAGATGAAC	842
抗-hHER2-LC-Y140-DSLEFIASKLA-P141	69	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCCGGGAGGCCAAGGTG	843
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTAGAAGTTGTTCAGCAGGCACAC	844
抗-hHER2-LC-P141-DSLEFIASKLA-R142	70	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG	845
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGTAGAAGTTGTTCAGCAGGC	846
抗-hHER2-LC-R142-	71	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG	847

【表８－１３】

DSLEFIASKLA-E143		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTCAGC	848
抗-hHER2-LC-E143-DSLEFIASKLA-A144	72	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG	849
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTC	850
抗-hHER2-LC-D151-DSLEFIASKLA-N152	73	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC	851
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCACCTTCCACTGCACCTTG	852
抗-hHER2-LC-N152-DSLEFIASKLA-A153	74	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGCAGAGCGGCAACAG	853
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTCCACCTTCCACTGCACC	854
抗-hHER2-LC-A153-DSLEFIASKLA-L154	75	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG	855
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCGTTGTCCACCTTCCACTG	856
抗-hHER2-LC-L154-DSLEFIASKLA-Q155	76	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGAGCGGCAACAGCCAGGAG	857
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCGTTGTCCACCTTCCAC	858
抗-hHER2-LC-Q155-DSLEFIASKLA-S156	77	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC	859
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCAGGGCGTTGTCCACCTTC	860
抗-hHER2-LC-E161-DSLEFIASKLA-S162	78	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGTCACCGAGCAGGACAGC	861
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCTGGCTGTTGCCGCTCTG	862
抗-hHER2-LC-S162-DSLEFIASKLA-V163	79	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG	863
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTCCTGGCTGTTGCCGC	864
抗-hHER2-LC-V163-DSLEFIASKLA-T164	80	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCGAGCAGGACAGCAAGGAC	865
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGACGCTCTCCTGGCTGTTGCC	866
抗-hHER2-LC-T164-DSLEFIASKLA-E165	81	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC	867
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGACGCTCTCCTGGCTGTTG	868
抗-hHER2-LC-E165-DSLEFIASKLA-Q166	82	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGACAGCAAGGACTCCACC	869
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGTGACGCTCTCCTGGC	870
抗-hHER2-LC-Q166-DSLEFIASKLA-D167	83	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACAGCAAGGACTCCACCTACAG	871
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCTCGGTGACGCTCTCCTG	872
抗-hHER2-LC-D167-DSLEFIASKLA-S168	84	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAAGGACTCCACCTACAGCC	873
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCTGCTCGGTGACGCTCTC	874
抗-hHER2-LC-T197-DSLEFIASKLA-H198	85	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACCAGGGCCTGTCCAGCC	875
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCACCTCGCAGGCGTACAC	876
抗-hHER2-LC-H198-DSLEFIASKLA-Q199	86	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGGCCTGTCCAGCCCC	877
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGGGTCACCTCGCAGGCG	878
抗-hHER2-LC-Q199-DSLEFIASKLA-G200	87	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCTGTCCAGCCCCGTG	879
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGTGGGTCACCTCGCAGG	880
抗-hHER2-LC-G200-DSLEFIASKLA-L201	88	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG	881
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTGGTGGGTCACCTCG	882
抗-hHER2-LC-L201-DSLEFIASKLA-S202	89	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC	883
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCCCTGGTGGGTCACC	884
抗-hHER2-LC-S202-DSLEFIASKLA-S203	90	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC	885
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACAGGCCCTGGTGGGTC	886
抗-hHER2-LC-S203-DSLEFIASKLA-P204	91	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAG	887
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGACAGGCCCTGGTGG	888
抗-hHER2-LC-K207-DSLEFIASKLA-S208	92	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC	889
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGTCACGGGGCTGGACAG	890

【表８－１４】

枯草菌(*B. subtilis*) Sfp pET22b		GAAGGAGATATACATATGAAAATTTATGGGATTTACATGGATCGC	891
		GTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGCAATTCTTCATAGGAGACCATCG	892
pET22b		CACCACCACCACCACCACTGAG	893
		CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC	894
枯草菌(*B. subtilis*)Sfp pET22b中へのTEV		GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCACCACCACCACCACCACTGAG	895
		GCCTTGGAAGTACAGGTTCTCCAGCAATTCTTCATAGGAGACCATCG	896
枯草菌(*B. subtilis*) Sfp K28E		GTCTTTCATTTCACCAGAGGAGCGCGAAAAATGCCGTCGCT	897
		AGCGACGGCATTTTTCGCGCTCCTCTGGTGAAATGAAAGAC	898
枯草菌(*B. subtilis*) Sfp T44E		AAAGAAGATGCTCACCGCGAGCTGCTGGGAGATGTGCTG	899
		CAGCACATCTCCCAGCAGCTCGCGGTGAGCATCTTCTTT	900
枯草菌(*B. subtilis*) Sfp C77Y		GCAGGAATATGGCAAACCGTATATTCCAGATCTTCCAGATGC	901
		GCATCTGGAAGATCTGGAATATACGGTTTGCCATATTCCTGC	902
大腸菌(*E. coli*) AcpS pET22b		AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAATATTAGGTTTAGGCACG	903
		CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGC	904
pET22b		CACCACCACCACCACCACTG	905
		ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATT	906
抗-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	99	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGC	907
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTATCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAGG	908
抗-hHER2-HC-S63-LEFIASK-V64	97	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGC	909
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAGG	910
抗-hHER2-HC-V64L-EFIAS-K65	98	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGAC	911
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAGG	912
抗-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	30	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTAC	913
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATGGTCAGAGTGAAATCCGTCC	914
抗-hHER2-HC-S132G-K133D-S134-T135L-S136-G137W-G138L-T139L-A140R-A141L-L142-G143N	101	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC	915
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGG	916
抗-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	103	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACAGCCGCCCTGGGCTGC	917
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGGGCCAGGG	918
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L	105	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGGCCCTGGGCTGCCTGGTG	919
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	920
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-LRLLN-A141	106	CTGAGACTGCTGAACGCCCTGGGCTGCCTGGTG	921
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	922
抗-hHER2-HC-T135G-S136D-G137S-G138L-T139S-WLLRLLN-A140	108	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGCCCTGGGCTGCCTG	923
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	924

【表８－１５】

抗-hHER2-HC-T359G-K360D-N361S-Q362L-V363S-S364W	123	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC	925
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	926
抗-hHER2-HC-S132G-K133D-S134-T135L-S136-G137W-G138L	100	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGACAGCCGCCCTGGGCTGC	927
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGG	928
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-A141L-L142R-G143L-C144L-L145N	107	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGAAGGACTACTTCCCCGAGC	929
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	930
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L	117	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	931
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC	932
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L-LRLLN-C200	118	CTGAGACTGCTGAACTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	933
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	934
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L-C200L-N201R-V202L-N203L-H204N	119	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG	935
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC	936
抗-hHER2-HC-E357G-M358D-T359S-K360L-N361S-Q362W-V363L	120	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG	937
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGAGGGGGGC	938
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWL-N389	126	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	939
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	940
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	109	GCGACAGCCTGAGCTGGCTGCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	941
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACTGTCACCACGCTGGACAG	942
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-Q196L-T197R-Y198L-I199L-C200N	111	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC	943
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACTGTCACCACGCTGGACAG	944
抗-hHER2- HC-L398G-D399-S400-D401L-G402S-S403W-F404L-LRLLN-F405	134	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG	945
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACTGGAGGTGTGGTCTTGTAG	946
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	110	CTGAGACTGCTGAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	947
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	948
抗-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	112	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	949
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACTGTCACCACGCTGGACAG	950
抗-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	113	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC	951
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCACTGTCACCACGCTGG	952

【表８－１６】

抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	115	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC	953
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTGG	954
抗-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416S-W417-Q418L-Q419L-G420R-N421L-V422L	137	AGCCTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG	955
		CAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCCACGGTCAGCTTGCTGTAC	956
抗-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416E-W417F-Q418I-Q419A-G420S-N421K-V422L	138	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG	957
		CAGCTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACGGTCAGCTTGCTGTAC	958
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385E-Q386F-P387I-E388A	125	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	959
		GGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCACTCCACGGCGATGTCGC	960
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385S-Q386W-P387L-E388L	124	GACAGCCTGAGCTGGCTGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	961
		CAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCCCACTCCACGGCGATGTCGC	962
抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	94	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCTGGTGGAGTCTGGCGG	963
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAACCTCAGCAGTGGCACCGGG	964
抗-hHER2-LC-I2-GDSLSWLLRLLN-Q3	26	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGATGACCCAGTCCCCGAGC	965
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGATATCAGCAGTGGCACCGGG	1095
抗-hHER2-LC-C214-GDSLSWLLRLLN	28	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	966
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCACTCGCCCCTGTTGAAGC	967
抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	27	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGATGACCCAGTCCCCGAG	968
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATATCAGCAGTGGCACCGGG	969
抗-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	29	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	970
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCACTCGCCCCTGTTGAAGC	971
抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	95	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCTGGTGGAGTCTGGCGG	972
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAACCTCAGCAGTGGCACCGG	973
抗-hHER2-HC-K447-GDSLSWLLRLLN	140	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	974
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCCGGGGGACAGGCTC	975
抗-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	141	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	976
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCCGGGGGACAGGCTC	977
抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	102	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC	978
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGCCAGGGGG	979
抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	114	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	980
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTGG	981
抗-hHER2-HC-S191D-	116	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	982

【表８－１７】

S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCACTGTCACCACGC	983
抗-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	135	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAG	984
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACTGGAGGTGTGGTCTTGTAG	985
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	131	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	986
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	987
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	130	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	988
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	989
pET22b/TEV		GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCAC	990
		ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC	991
		CACCACCACCACCACCACTGAG	992
PPTアーゼ_C・サーモセラム(*C. thermocellum*)_pET22b/TEV		TTGGAAGTACAGGTTCTCACGTTCGCAGAGGAATTTACACACTTC	993
		TAAGAAGGAGATATACATATGGGTTTTCTGCCGAAAGAGAAAAAG	994
ACP_C・サーモセラム(*C. thermocellum*)_pET22b		GTGGTGGTGGTGGTGGCTATTATTTTTAATATATTCAACGACGTCGC	995
		TAAGAAGGAGATATACATATGTTCGAGAAAGTCCGTAAAATCATTGC	996
ACP_C・サーモセラム(*C. thermocellum*)_pET22b		GTGGTGGTGGTGGTGGTGCGCCTGGTGGCCGTTGATGTAATC	997
		TAAGAAGGAGATATACATATGAGCACTATCGAAGAACGCGTTAAG	998
抗-hHER2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389	132	CTGGACATGCTGGAGTGGAGCCTGATGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	999
		CCACTCCAGCATGTCCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	1000
抗-hHER2-HC-V2-GDSLDMLEWSLM-Q3	96	CTGGACATGCTGGAGTGGAGCCTGATGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGG	1001
		CCACTCCAGCATGTCCAGGCTGTCGCCAACCTCAGCAGTGGCACCGG	1002
mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	148	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG	1003
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCATCTCCTCCCGGGATG	1004
mAb2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	149	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAACTACAAGACCACGCCTCCC	1005
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCGGCTGCCCATTGCTCTC	1006
抗-hHER2-HC-Y296-GDSLSWLLRLLN-N297	143	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC	1007
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTACTGCTCCTCTCTGGGCTTG	1096
抗-hHER2-HC-N297-GDSLSWLLRLLN-S298	145	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC	1008
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTACTGCTCCTCTCTGGGC	1097
抗-hHER2-HC-Y296-DSLEFIASKLA-N297	144	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC	1009
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTACTGCTCCTCTCTGGGCTTG	1098
抗-hHER2-HC-N297-DSLEFIASKLA-S298	146	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCTACAGGGTGGTGTCC	1010
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTACTGCTCCTCTCTGGGC	1099
Tras_HC_S6_i415_S418A		GCCCGAGGGCGACGCCCTGAGCTGGCTG	1011
		CAGCCAGCTCAGGGCGTCGCCCTCGGGC	1100
ヒトPPTアーゼ_N-His6(PIPEクローニング)(配列番号1106に開示されるとおりの「His6」)		CATCACCATCACCATCACGTTTTCCCTGCCAAACGGTTCTGC	1012
		ACGGGCCCTCTAGACTTATGACTTTGTACCATTTCGTATTGGAATTTC	1101
pRS_N-His6 (PIPEクローニング)(配列番号1106に開示されるとおりの「His6」)		TAAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACC	1013
		GTGATGGTGATGGTGATGAGGCTGAGCAGTGGCACCGG	1102

【表８－１８】

ヒトPPTアーゼ_C-His6(PIPEクローニング)(配列番号1106に開示されるとおりの「His6」)		GGTGCCACTGCTCAGCCTGTTTTCCCTGCCAAACGGTTCTGC GTGATGGTGATGGTGATGTGACTTTGTACCATTTCGTATTGGAATTTC	1014 1103
pRS_C-His6 (PIPEクローニング)(配列番号1106に開示されるとおりの「His6」)		CATCACCATCACCATCACTAAGTCTAG AGGCTGAGCAGTGGCACCGG	1015 1104
T・マリティマ(*T. maritima*)PPTアーゼ		ATGATAGTCGGTGTGGGTATTGATG TTACTCTCCGATGAGGATGTTACC	1016 1105

上段=フォワードプライマー
下段=リバースプライマー

【表９－１】

表9. 挿入/グラフトされたペプチドタグを有するトラスツズマブIgGの発現収量(HC、重鎖;LC、軽鎖)。括弧()、[]内の値は、スケールアップ後の抗体収量に対応する。

構築物(全抗体を検査、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙しない)	培養液1リットルあたりの収量(mg)	発現スケール(L)	配列番号
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L	26	0.02	105
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L	73	0.02	117
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	61 (36)	0.02 (1)	109
抗-hHER2-HC-T359G-K360D-N361S-Q362L-V363S-S364W	43	0.02	123
抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	45 (29)	0.02 (1)	121
mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	78	0.05	148
mAb2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	26	0.05	149
抗-hHER2-HC-E357G-M358D-T359S-K360L-N361S-Q362W-V363L	59	0.02	120
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	39 (13) [16]	0.02 (1) [0.5]	127
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWL-N389	39	0.02	126
抗-hHER2-LC-C214-GDSLSWLLRLLN	42	0.02	28
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-LRLLN-A141	2	0.05	106
抗-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	19	0.05	103
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	48	0.3	110
抗-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	33	0.05	113
抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	20 (11)	0.05 (0.5)	94

【表９－２】

抗-hHER2-LC-I2-GDSLSWLLRLLN-Q3	3	0.05	26
抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	43 (29)	0.05 (0.4)	27
抗-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	55	0.05	29
抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	34 (20)	0.05 (0.4)	95
抗-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	32	0.05	141
抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	32	0.05	102
抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	41	0.05	114
抗-hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K	30	0.05	116
抗-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	13	0.05	135
抗-hHER2-HC-Y296-GDSLSWLLRLLN-N297	23	0.05	143
抗-hHER2-HC-N297-GDSLSWLLRLLN-S298	23	0.05	145
抗-hHER2-HC-Y296-DSLEFIASKLA-N297	21	0.05	144
抗-hHER2-HC-N297-DSLEFIASKLA-S298	23	0.05	146
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	36 (15)	0.05 (0.5)	129
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	35 (20)	0.05 (0.5)	130
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	56	0.05	131
抗-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	43 (18)	0.05 (0.5)	122
抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	19	0.05	115
抗-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	40	0.05	112
抗-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416E-W417F-Q418I-Q419A-G420S-N421K-V422L	29	0.05	138
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385E-Q386F-P387I-E388A	39	0.05	125
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385S-Q386W-P387L-E388L	33	0.05	124
抗-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	13	0.05	30
抗-hHER2-HC-S63-LEFIASK-V64	12	0.05	97
抗-hHER2-HC-V64L-EFIAS-K65	23	0.05	98
抗-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	11	0.05	99
抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389	8 (19)	0.05 (0.4)	142
抗-hHER2-HC-V2-GDSLDMLEWSLM-Q3	56	0.05	96
抗-hHER2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389	32	0.05	132

【実施例３】

【０５２３】

Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ（ＰＰＴアーゼ）の生成

枯草菌（B. subtilis）Ｓｆｐ　ＰＰＴアーゼを、ｐＥＴ２２ｂ発現ベクターに、ＰＩ

ＰＥ法を使用してクローニングした（Klockら、Proteins 71:982～994 (2008)を参照されたい）。末端$Ｈｉｓ_6$タグ（配列番号１１０６）の切断を可能にするために、ＴＥＶ（タバコエッチウイルス（tobacco etch virus）プロテアーゼ認識部位を、Ｓｆｐコード配列の下流に挿入した。クローニングのために使用したすべてのプライマーは表８に列挙している。

【０５２４】

タンパク質の発現および精製は、いくつかの小さな改変を伴うがYinらに従って行った（Nat. Protoc. 1:280-285(2006)を参照されたい）。初めに、ｐＥＴ２２ｂ／ｓｆｐ発現プラスミドを持つ大腸菌（E. coli）ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞のグリセロールストックから、ＬＢスターター培養液５ｍＬに接種した。培養液を３７℃にて３００ｒｐｍで一晩インキュベートすることによって飽和するまで成長させた。翌日、このスターター培養液を使用して、ＴＢ培地１Ｌ（Ｓｉｇｍａ）に接種し、これを３００ｒｐｍでかき混ぜ、３７℃にて維持した。６００ｎｍで０．５の光学密度に達した後に、培養液を、ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで添加することによって誘発し、温度を３０℃まで下げた。培養液をさらに１２～１６時間振盪し、細菌細胞を遠心分離によって採集した。使用前は、細胞ペレットを－２０℃にて貯蔵した。

【０５２５】

タンパク質の精製を開始するために、凍結したペレットを氷上で１５分間融かし、２０ｍＭトリス／ＨＣｌ（ｐＨ７．９）、０．５Ｍ ＮａＣｌ、５ｍＭイミダゾール、および２Ｕ／ｍＬ ＤＮアーゼＩを含有する緩衝液中に再懸濁させた（細胞湿潤重量１ｇあたり緩衝液３ｍＬ）。細胞溶解を、０．５秒のスイッチオンおよび０．５秒のスイッチオフの間隔で４分間音波処理することによって誘発した。不溶性の細胞破片を除去するために、生じた溶解液を４０，０００×ｇで４℃にて２０分間遠心分離した。次いで、$Ｈｉｓ_6$タグ付きＳｆｐ酵素（「$Ｈｉｓ_6$」は配列番号１１０６として開示）を、５０％Ｎｉ－ＮＴＡスラリー（Ｑｉａｇｅｎ）４ｍＬを透明溶解液に添加することによって捕捉した。４℃にて１時間振盪した後に、樹脂－溶解液混合物を使い捨てカラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に注いだ。沈降した樹脂を５０ｍＭ $ＮａＨ_2ＰＯ_4$、３００ｍＭ ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）２５カラム体積で洗浄し、５０ｍＭ $ＮａＨ_2ＰＯ_4$、３００ｍＭ ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）５カラム体積で溶離した。次いで、精製Ｓｆｐ酵素を１０ｍＭトリス／ＨＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１０％グリセロール（ｐＨ７．５）に対して、３．５ｋＤａカットオフのＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｃａｓｓｅｔｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用して２回透析し、その後、少なくとも１００μＭの最終濃度まで、１０ｋＤａカットオフのＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－１５ Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ Ｆｉｌｔｅｒ Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。最後に、濃縮酵素を分取し、液体窒素中でフラッシュ凍結させ、－８０℃で貯蔵した。

【０５２６】

逆Ｎｉ－ＮＴＡクロマトグラフィーを使用してＳｆｐの純度を上げるために、ＴＥＶ切断部位を、Ｃ末端$Ｈｉｓ_6$タグ（配列番号１１０６）の前に導入した。この構築物のＮｉ－ＮＴＡ精製は上記のとおりに行った。しかしながら、溶離の後に、Ｓｆｐ酵素を、５０ｍＭトリス／ＨＣｌ、５０ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）を含有するＴＥＶ切断緩衝液に交換した。$Ｈｉｓ_6$タグ（配列番号１１０６）除去を、７％（ｗ／ｗ）ＴＥＶプロテアーゼで２３℃にて１時間、次いで４℃にて１６時間の消化によって実施した。次いで、ＴＥＶ消化されたＳｆｐ酵素を１×ＰＢＳ（ｐＨ７．２）で平衡化させたＮｉ－ＮＴＡカラムに再負荷した。切断酵素をカラムフロースルー、および５０ｍＭ $ＮａＨ_2ＰＯ_4$、３００ｍＭ ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）５カラム体積を用いる洗浄ステップから収集した。次いで、精製Ｓｆｐ酵素を１０ｍＭトリス／ＨＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ、１０％グリセロール（ｐＨ７．５）に対して、３．５ｋＤａカットオフのＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｃａｓｓｅｔｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用して２回透析した。透析の後に、Ｓｆｐを少なくとも１００μＭの最終濃度まで、１０ｋＤａカ

ットオフのＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。最後に、濃縮酵素を分取し、液体窒素中でフラッシュ凍結させ、－８０℃で貯蔵した。

【０５２７】

Ｓｆｐの純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価した。$Ｈｉｓ_{6}$タグ（配列番号１１０６）除去をＬＣ－ＭＳによって検査し、Ｓｆｐ収量を、２８０ｎｍでの紫外線分光法（ＮＤ－１０００　ＵＶ－Ｖｉｓ　Ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ、ＮａｎｏＤｒｏｐ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ、ＤＥ）によって、$２８６２０Ｍ^{-1}ｃｍ^{-1}$のモル吸光係数を使用して定量化した。培養液１リットルあたりＴＥＶ－切断Ｓｆｐ酵素４８ｍｇが得られた。

【実施例４】

【０５２８】

ＰＰＴアーゼ相同体および変異体の同定および生成

Ｓｆｐ変異体Ｒ４－４

標準的な分子生物学的方法を使用して、本発明者らは、枯草菌（Ｂ．subtilis）ＳｆｐＰＰＴアーゼに次の変異を挿入した：Ｌｙｓ２８Ｇｌｕ、Ｔｈｒ４４Ｇｌｕ、およびＣｙｓ７７Ｔｙｒ。変異誘発反応のために使用したオリゴヌクレオチドの配列は表８に列挙している。

【０５２９】

タンパク質発現のために、ＴＢ培地０．５Ｌに、スターター培養液５ｍＬを接種した。その培養液を３００ｒｐｍでかき混ぜ、３７℃で維持した。６００ｎｍで０．５の光学密度に達した後に、培養液を、ＩＰＴＧを１ｍＭの最終濃度まで添加することによって誘発し、温度を３０℃まで下げた。培養液をさらに１６時間３００ｒｐｍで振盪し、細菌細胞を遠心分離によって採集した（３４００ｒｐｍで１５分）。使用前は、細胞ペレットを－２０℃にて貯蔵した。

【０５３０】

凍結したペレットを氷上で１０分間融かし、５０ｍＭトリス／ＨＣｌ（ｐＨ８）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール、１Ｕ／ｍＬ　ＤＮアーゼＩ、およびｃｏｍｐｌｅｔｅ（商標）ＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害薬カクテル錠剤（Ｒｏｃｈｅ）を含有する緩衝液中に再懸濁させた（細胞湿潤重量１ｇあたり緩衝液３ｍＬ）。細胞溶解を、氷上で０．５秒のスイッチオンおよび０．５秒のスイッチオフの間隔で３分間音波処理することによって誘発した。氷上でさらに１０分間インキュベートした後に、溶解液を４０，０００×ｇで４℃にて３０分間遠心分離した。次いで、$Ｈｉｓ_{6}$タグ付きＳｆｐ変異体Ｒ４－４（「$Ｈｉｓ_{6}$」は配列番号１１０６として開示）を、５０％Ｎｉ－ＮＴＡスラリー（Ｑｉａｇｅｎ）２ｍＬを透明溶解液に添加することによって捕捉した。４℃にて１時間振盪した後に、樹脂－溶解液混合物を使い捨てカラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に注いだ。フロースルーを収集し、沈降した樹脂を５０ｍＭトリス、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）５０カラム体積で洗浄し、５０ｍＭトリス、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）５カラム体積で溶離した。溶離液を、５０ｍＭトリス／ＨＣｌ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０）を含有するＴＥＶプロテアーゼ切断緩衝液に、ＰＤ－１０カラムを使用して緩衝液交換した後に、$Ｈｉｓ_{6}$タグ（配列番号１１０６）除去を、７％（ｗ／ｗ）ＴＥＶプロテアーゼで２３℃にて１時間、次いで４℃にて１６時間消化することによって実施した。

【０５３１】

次いで、ＴＥＶ消化されたＳｆｐ変異体Ｒ４－４を、１×ＰＢＳ（ｐＨ７．２）で平衡化させたＮｉ－ＮＴＡカラム（床体積１ｍＬ）に再負荷した。切断酵素をカラムフロースルーから、および５０ｍＭトリス、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール（ｐＨ８．０）５カラム体積を用いる洗浄ステップから収集した。次いで、精製Ｓｆｐ変異体Ｒ４－４を、１０ｍＭトリス／ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０％グリセロール（ｐＨ７．５）に対して、ＰＤ－１０カラムを使用して緩衝液交換した。ＢＳＡを標準として使用す

るブラッドフォードアッセイによると、この酵素は、３．１ｍｇ／ｍＬの最終濃度を１７ｍＬの最終体積で有し、これは、培養液１リットルあたりＴＥＶ切断Ｒ４－４変異体１０５ｍｇに対応する。最後に、酵素を１００～１０００μＬ画分に分取し、液体窒素中でフラッシュ凍結させ、－８０℃で貯蔵した。酵素の純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって評価し、$Ｈｉｓ_{6}$タグ（配列番号１１０６）除去をＥＳＩ－ＭＳによって検査した。

【０５３２】

ＡｃｐＳ

標準的な分子生物学的方法を使用して、本発明者らは、大腸菌（E. coli）Ｋ－１２からのａｃｐＳ遺伝子を、Ｃ末端Ｈｉｓ６タグ（配列番号１１０６）を有する組換え酵素の発現を可能にするｐＥＴ２２ｂベクターにクローニングした。クローニングのために使用したオリゴヌクレオチドの配列は表８に列挙している。

【０５３３】

飽和５ｍＬスターター培養液から接種した後に、ＡｃｐＳ酵素をＴＢ培地１Ｌ中で発現させた。３７℃にて３００ｒｐｍで培養液を振盪した後に、タンパク質生成を、１ｍＭＩＰＴＧを０．５の光学密度（６００ｎｍ）で添加することによって誘発した。タンパク質発現を３０℃および３００ｒｐｍにて一晩実施した。翌日、細胞を３４００ｒｐｍで１５分間の遠心分離によって採集した。細胞ペレットを、タンパク質精製の前に、－２０℃で貯蔵した。

【０５３４】

タンパク質精製を開始するために、凍結したペレットを氷上で１０分間融かし、５０ｍＭトリス／ＨＣｌ（ｐＨ８）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール、１Ｕ／ｍＬ　ＤＮアーゼＩ、およびｃｏｍｐｌｅｔｅ（商標）ＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害薬カクテル錠剤（Ｒｏｃｈｅ）を含有する緩衝液中に再懸濁させた（細胞湿潤重量１ｇあたり緩衝液３ｍＬ）。細胞溶解を、氷上の細胞懸濁液を、０．５秒のスイッチオンおよび０．５秒のスイッチオフの間隔で３分間音波処理することによって達成した。氷上でのさらなる１０分間のインキュベーション期間の後に、溶解液を４０，０００ｇで４℃にて３０分間遠心分離した。次いで、５０％Ｎｉ－ＮＴＡスラリー２ｍＬを透明溶解液に加え、溶解液／樹脂混合物を４℃にて１時間振盪した。溶解液／樹脂混合物を使い捨てカラムに注いだ。フロースルーを収集した後に、Ｎｉ－ＮＴＡカラムを、５０ｍＭトリス（ｐＨ８）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、および２０ｍＭイミダゾールを含有する緩衝液５０カラム体積で洗浄した。溶離を、５０ｍＭトリス（ｐＨ８）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、および２５０ｍＭイミダゾールを含有する緩衝液５カラム体積で行った。３．５ｋＤａカットオフ透析カセット（Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、溶離液を、５０ｍＭトリス（ｐＨ８）および３００ｍＭ　ＮａＣｌを含有する緩衝液に一晩透析した。沈澱したタンパク質を、０．４５μｍフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用することによって除去した。グリセロールを１０％（ｖ／ｖ）の最終濃度まで添加した後に、Ｎｉ－ＮＴＡ－精製タンパク質を液体窒素中でフラッシュ凍結させ、－８０℃にて貯蔵した（１００μＬおよび２００μＬアリコット）。ＡｃｐＳの純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価し、収量を、ＢＳＡを標準として使用するブラッドフォードアッセイによって定量化した。培養液１リットルあたりＡｃｐＳ酵素約１３ｍｇが得られた。

【０５３５】

Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ

Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼの発現を、１Ｌスケールで、天然ＦＭ培地中で、１０ｍＬ飽和スターター培養液を接種することによって実施した。培養液１Ｌを３００ｒｐｍで３７℃の温度にて振盪した。２．５時間後に、培養液は６００ｎｍで０．５の光学密度に達した。タンパク質生成を、アラビノースを０．１％（ｗ／ｖ）の最終濃度まで添加することによって誘発し、培養液をさらに４時間振盪した。細胞を４０００ｒｐｍで１５分間遠心分離することによって採集し、細胞ペレットを－２０℃で貯蔵した。

【０５３６】

Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼの初めの精製はＩＭＡＣ（固定化金属アフ

ィニティークロマトグラフィー）によって、Ｎｉ－ＮＴＡアガロース樹脂（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して行った。細胞ペレットを融かし、溶解緩衝液（４０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ８．０）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール、１ｍＭ　ＴＣＥＰ）６０ｍＬに再懸濁させた。細胞懸濁液を氷上で１．５分間音波処理し（１秒パルスを使用）、１５０００ｒｐｍで５℃にて３０分間遠心分離した。透明溶解液を１．５ｍＬ　Ｎｉ－ＮＴＡカラム上に負荷した。フロースルーを収集した後に、カラムを洗浄緩衝液５カラム体積（４０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ８．０）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、４０ｍＭイミダゾール、１０％グリセロール、１ｍＭ　ＴＣＥＰ）で洗浄した。タンパク質溶離を、溶離緩衝液２カラム体積（２０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ８．０）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３００ｍＭイミダゾール、１ｍＭ　ＴＣＥＰ）で実施した。

【０５３７】

Ｎｉ－ＮＴＡ溶離液を、Ａｋｔａ　ＦＰＬＣシステムに接続されたＳｕｐｅｒｄｅｘ７５カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してさらに精製した。サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を１ｍＬ／分の流速で、１ｍＭ　ＥＤＴＡおよび１０％（ｖ／ｖ）グリセロールを補充した１０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．４）中で行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによってタンパク質含有画分を分析した後に、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼを含有する画分を貯留し、ＳＥＣのために前に使用した緩衝液に対して再び透析した。次いで、精製酵素を、１０ｋＤａカットオフのＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。沈澱物を、１３０００ｒｐｍで２分間、テーブルトップ遠心分離器を使用して遠心分離することによって除去した。濃縮タンパク質（１．０ｍｇ／ｍＬ、４８μＭ）を１００μＬ画分に分取し、液体窒素中でフラッシュ凍結させ、－８０℃で貯蔵した。Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼの純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価し、収量を、標準としてＢＳＡを使用するブラッドフォードアッセイによって定量化した。すべての精製ステップの後に、培養液１リットルあたりＡｃｐＳ酵素１．４ｍｇが得られた。

【実施例５】

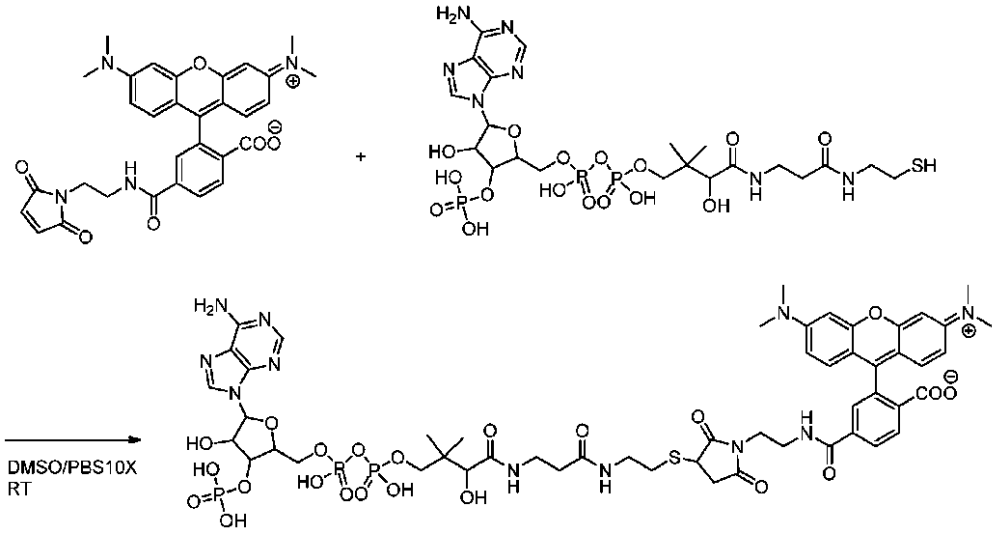
【０５３８】

補酵素Ａ（ＣｏＡ）類似体の合成

ＣｏＡ－マレイミドエチルアミド－テトラメチルローダミン

【０５３９】

【化２０３】



ＤＭＳＯ３００μＬに溶かしたテトラメチルローダミン－Ｃ２－マレイミド（５．５ｍｇ、１０．４μｍｏｌ）をＣｏＡ（水１５０μＬ中で１０．４μｍｏｌ）に１０×ＰＢＳ緩衝液７５０μＬ中で加え２３℃にて１時間撹拌した。反応の後に、反応混合物を凍結乾燥させて、粗製の生成物を得、これをＲＰ－Ｃ１８フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。所望の生成物の画分を合わせ、凍結乾燥させて、ＣｏＡ－マレイミドエチル

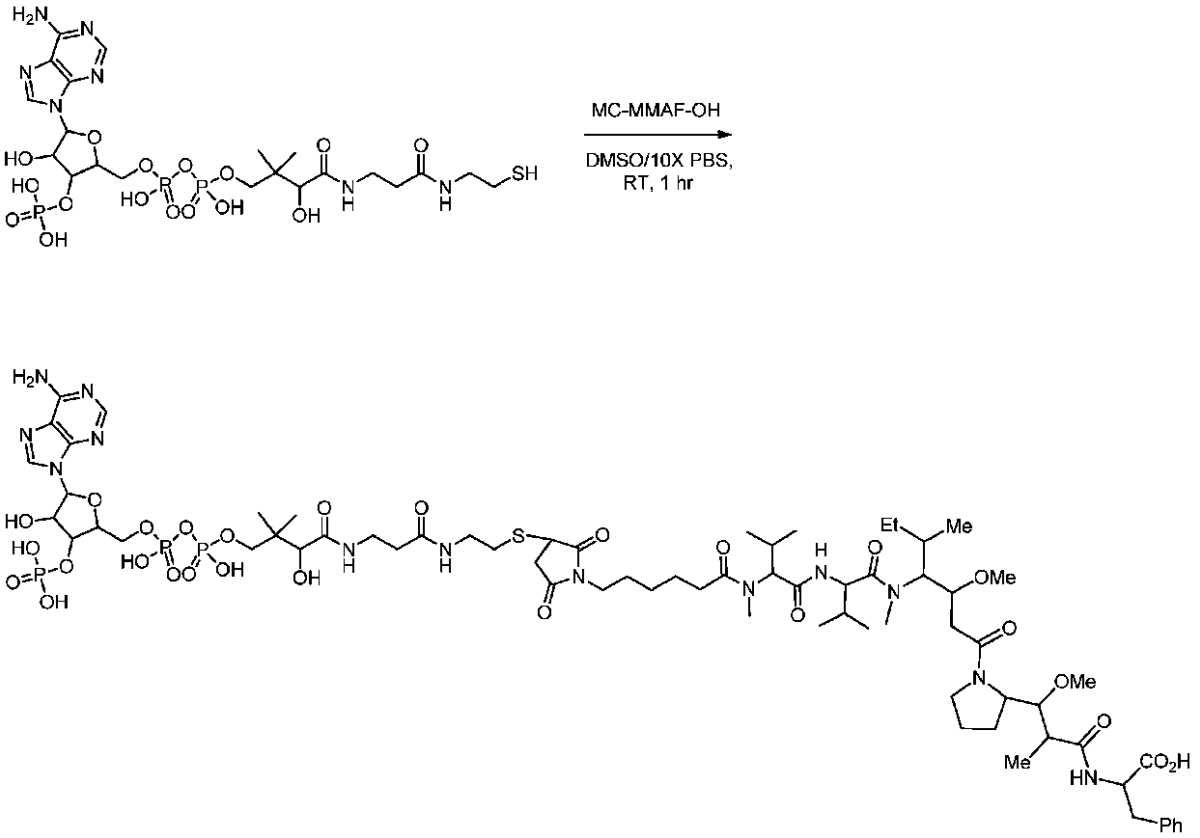
アミド－テトラメチルローダミン（純度９４．４％で９．８ｍｇ）を暗紫色の粉末として得た。$C_{52}H_{64}N_{11}O_{22}P_3S$でのＥＳＩ－ＭＳ算出値［ＭＨ］$^+$：１３２０．３；観察値：１３２０．３。

【０５４０】

ＣｏＡ－マレイミドカプロイル（ＭＣ）－ＭＭＡＦ

【０５４１】

【化２０４】



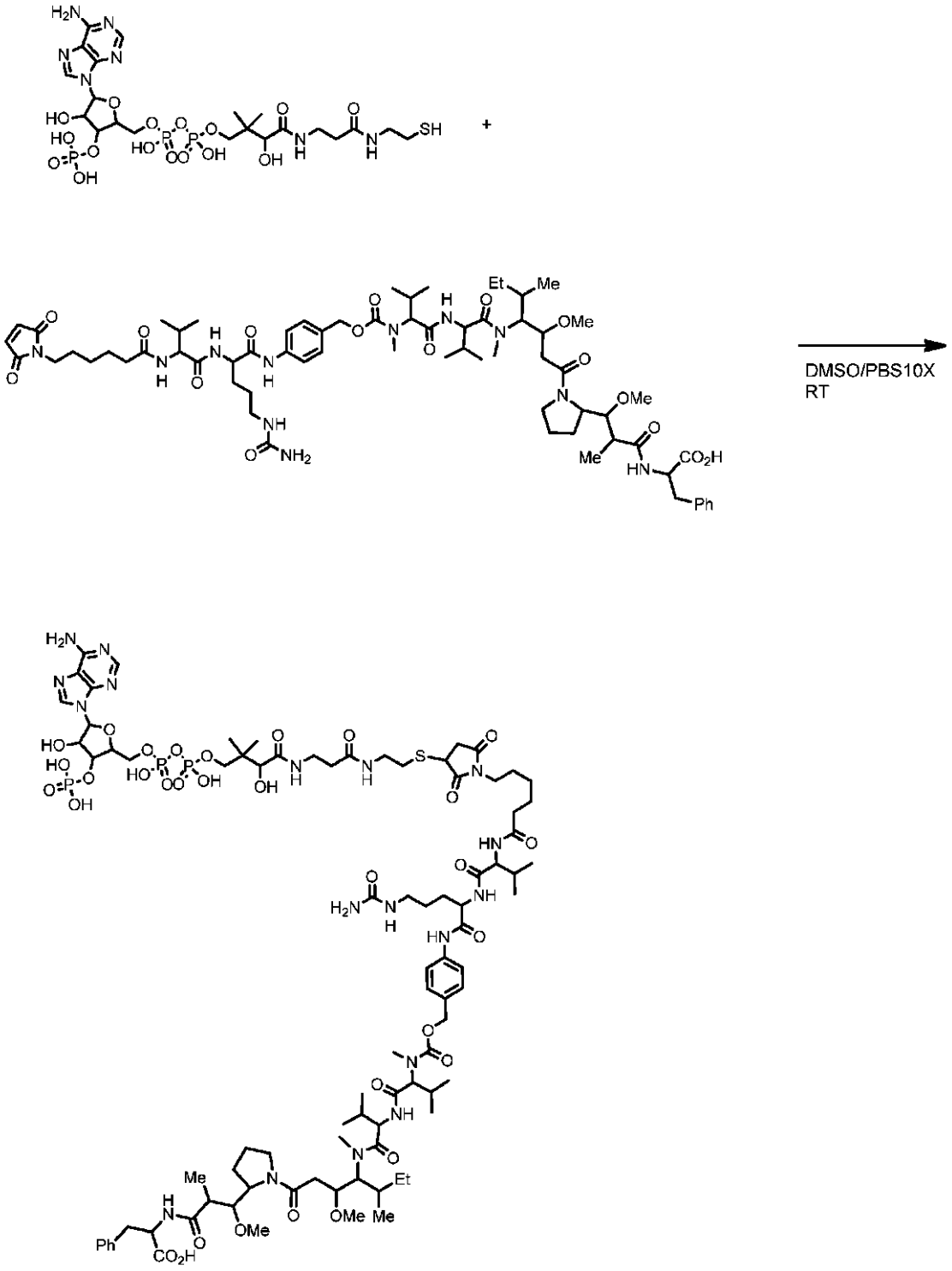
ＤＭＳＯ１．８ｍＬに溶かしたＭＣ－ＭＭＡＦ（Doroninaら、Bioconj. Chem. 17:114～124 (2006)を参照されたい）（３６．０ｍｇ、３８．９μｍｏｌ）をＣｏＡ（水３１２μＬ中で３９．０μｍｏｌ）に１０×ＰＢＳ緩衝液２．９ｍＬ中で加え、２３℃で１時間撹拌した。反応の後に、反応混合物を凍結乾燥させて、粗製物質を得、これをＲＰ－Ｃ１８フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。所望の生成物の画分を合わせ、凍結乾燥させて、ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ（純度９７．５％で３５．５ｍｇ）を白色の粉末として得た。$C_{70}H_{112}N_{13}O_{27}P_3S$でのＥＳＩ－ＭＳ算出値［ＭＨ］$^+$：１６９１．７；観察値：１６９１．２。

【０５４２】

ＣｏＡ－ＭＣ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ

【０５４３】

【化２０５】



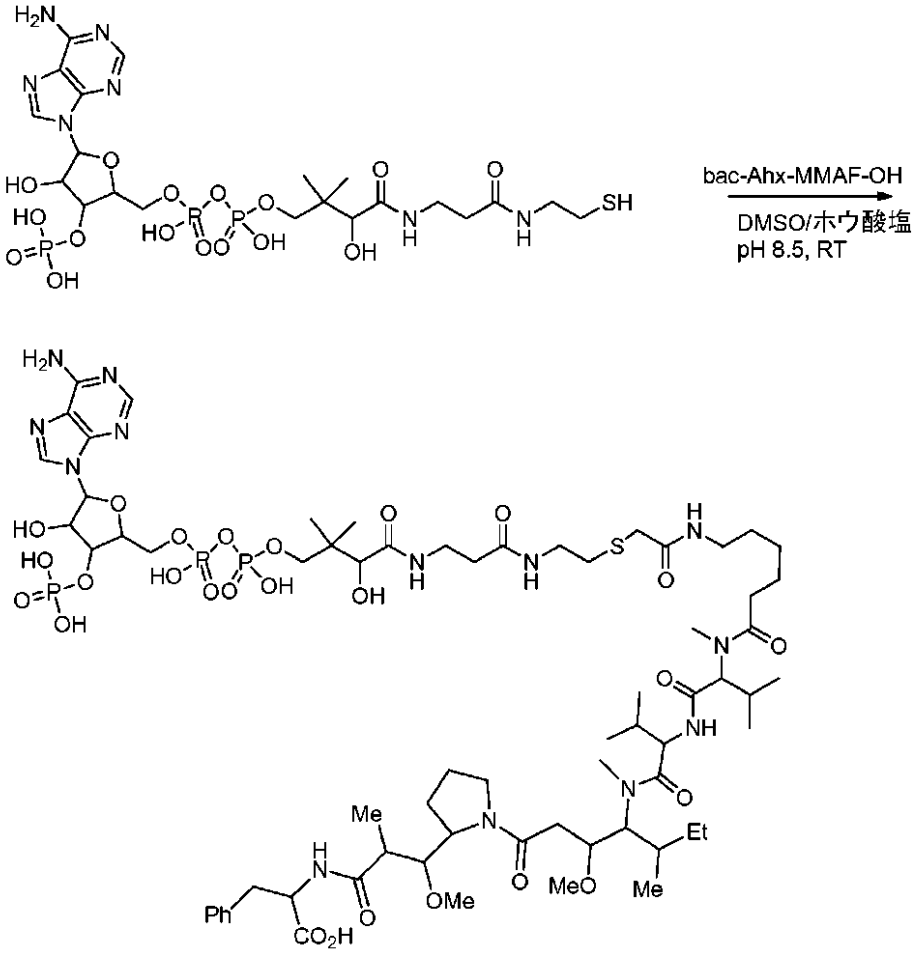
ＤＭＳＯ３００μＬに溶かしたＭＣ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ（Doroninaら、Bioconj. Chem. 17:114～124 (2006)を参照されたい）（５．７ｍｇ、４．３μｍｏｌ）をＣｏＡ（水３４μＬ中で４．３μｍｏｌ）に１０×ＰＢＳ緩衝液２６６６μＬ中で加え、２３℃で１時間撹拌した。反応の後に、反応混合物を凍結乾燥させて、粗製物質を得、これをＲＰ－Ｃ１８フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。所望の生成物の画分を合わせ、凍結乾燥させて、ＣｏＡ－ＭＣ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ（純度９８．０％で６．１ｍｇ）を白色の粉末として得た。$C_{89}H_{139}N_{18}O_{32}P_3$ＳでのＥＳＩ－ＭＳ算出値［$MH_2$］$^{2+}$／２：１０４９．４；観察値：１０４９．４。

【０５４４】

ＣｏＡ－Ａｃ－Ａｈｘ－ＭＭＡＦ

【０５４５】

【化２０６】



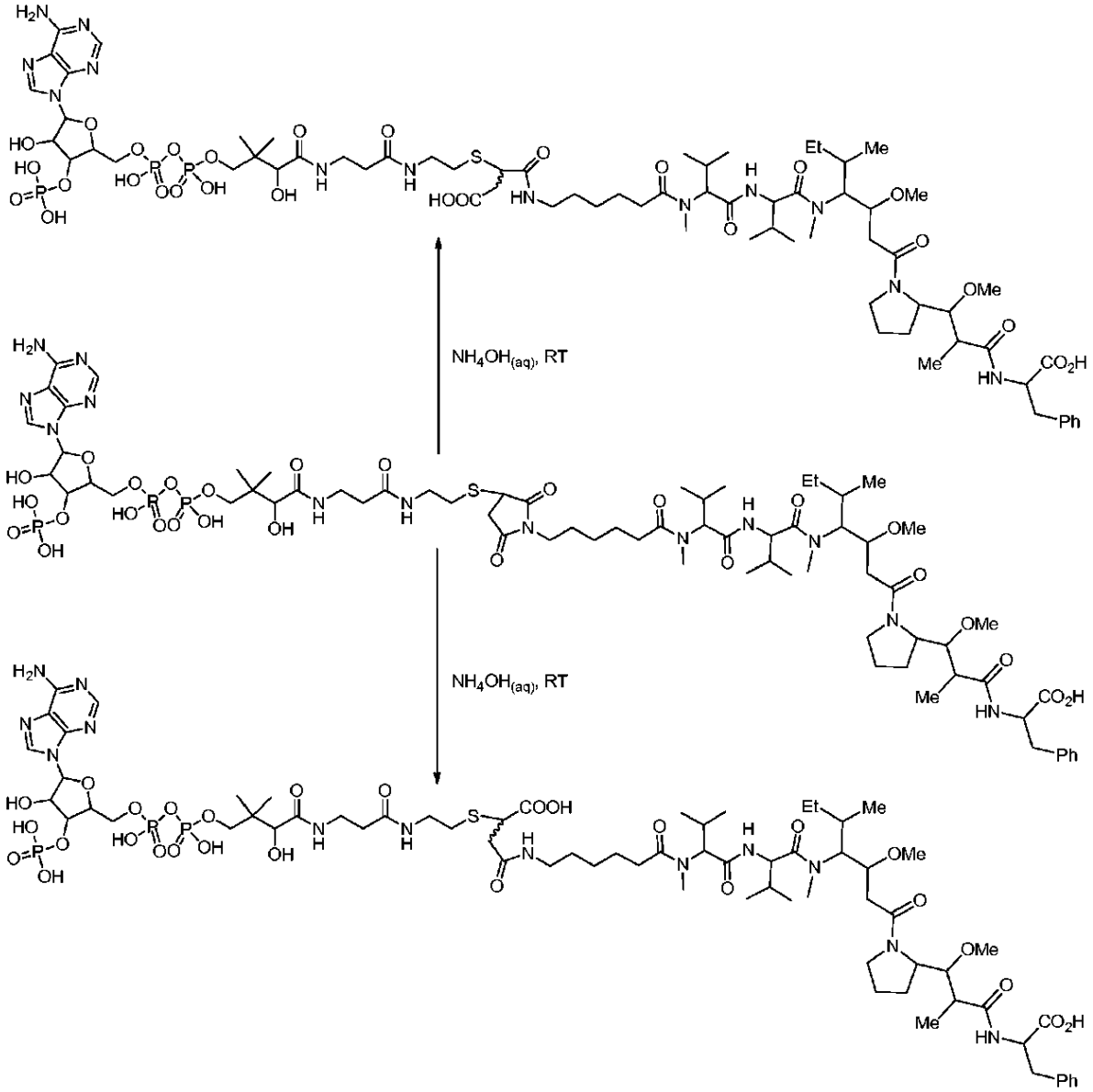
ＤＭＳＯ４００μＬに溶かしたブロモアセチル－Ａｈｘ－ＭＭＡＦ（Alleyら、Bioconj. Chem. 19:759～765(2008)を参照されたい）（１．３ｍｇ、１．４μｍｏｌ）をＣｏＡ（水４３μＬ中で５．４μｍｏｌ）にホウ酸塩緩衝液３．６ｍＬ（ｐＨ８．５で６．７ｍＭ）中で加え、２３℃で２４時間撹拌した。反応の後に、反応混合物を凍結乾燥させて、粗製物質を得、これをＲＰ－Ｃ１８フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。所望の生成物の画分を合わせ、凍結乾燥させて、ＣｏＡ－Ａｃ－Ａｈｘ－ＭＭＡＦ（純度９６．９％で１．１ｍｇ）を白色の粉末として得た。$C_{68}H_{112}N_{13}O_{26}P_3S$でのＥＳＩ－ＭＳ算出値［ＭＨ］$^+$：１６５１．７；観察値：１６５１．３。

【０５４６】

ＣｏＡ－開環－ＭＣ－ＭＭＡＦ

【０５４７】

【化２０７】



ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ（水１ｍＬ中で５μｍｏｌ）を１Ｍ　NH_4OH（水溶液）９ｍＬに添加し、２３℃にて３０分間撹拌した。反応の後に、反応混合物を凍結乾燥させて、粗製物質を得、これをＲＰ－Ｃ１８フラッシュクロマトグラフィーによって精製した。所望の生成物の画分を合わせ、凍結乾燥させて、マレイミド開環ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ３．９ｍｇを、上記のスキームに示すとおりの４種の位置異性体およびジアステレオ異性体の混合物（白色の粉末、純度９６．６％）として得た。$C_{70}H_{114}N_{13}O_{28}P_3S$でのＥＳＩ－ＭＳ算出値［ＭＨ］$^+$：１７０９．７；観察値：１７０９．２。

【実施例６】

【０５４８】

インビトロでのＣｏＡ類似体でのペプチドタグ付きＩｇＧの標識

インビトロでのペプチドタグ付きＩｇＧとのＣｏＡ類似体の単一ステップコンジュゲーションを例示するために、様々なペプチドタグ付きトラスツズマブ構築物を、Ｓｆｐ酵素が存在する状態でＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと反応させた。一般に、コンジュゲーション反応を１０．０ｍＭまたは１２．５ｍＭ　$MgCl_2$を補充した５０ｍＭまたは７５ｍＭＨＥＰＥＳまたはトリス緩衝液、ｐＨ７．５または８．０中で実施した。ペプチドタグ付きトラスツズマブの最終濃度を、ペプチドタグ１個あたり５．０μＭに対応する２．５μＭで一定に維持した一方で、ＣｏＡ基質の最終濃度を通常、４０μＭ～１００μＭで変化

させた。コンジュゲーション反応を開始するために、Ｓｆｐ酵素を加えて、典型的には１μＭの最終濃度を得た。酵素反応を、２３℃または３７℃のいずれかにて１６時間進行させた。この時間の後に、反応の進行をＥＳＩ－ＭＳおよびＨＰＬＣによって分析した。

【実施例７】

【０５４９】

挿入の標識

Ｓ６タグまたはｙｂｂＲタグが挿入されている異なる標的に対する６種のトラスツズマブ抗体および１種の第２抗体（「ｍＡｂ２」）とのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦのほぼ定量的なコンジュゲーションを、反応混合物をＳｆｐと共に、実施例６において記載したとおりにインキュベートすることによって達成した。抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１、図５Ａ）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７、図５Ｂ）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ３（配列番号９５、図５Ｃ）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３（配列番号９４、図５Ｄ）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ－Ｎ３８９（配列番号１３０、図５Ｅ）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１２９、図５Ｆ）、およびｍＡｂ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１４８、図５Ｇ）の単一ステップコンジュゲーション反応混合物（表１０）のＨＰＬＣによって、タグ付き抗体が、ほぼ２の薬物－対－抗体比（ＤＡＲ）を有する免疫コンジュゲートへとほぼ完全に変換されたことが示される。還元コンジュゲート試料のＥＳＩ－ＭＳは、設計された重鎖のみの部位特異的修飾を示唆している。抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ－Ｉ２－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ３（配列番号２７、図５Ｈ）では、ＨＰＬＣによって、かなりの量の未修飾抗体（３９％、保持時間４．８分）が保持されていて、ＤＡＲ＝１（４６％、保持時間５．４分）およびＤＡＲ＝２（１６％、保持時間５．９分）の種の混合物が観察されるので、免疫コンジュゲートの部分的な形成のみが示唆されている。

【０５５０】

【表１０】

表10. 挿入タグとのコンジュゲーション反応のMSおよびHPLC分析

配列番号	抗体構築物(全抗体が検査され、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙されていない)	観察質量(Da)	免疫コンジュゲートの期待質量(Da)	未修飾抗体の期待質量(Da)	HPLCによるDAR=2
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	51785.20	51791	50525	92%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	51786.40	51791	50525	97%
95	抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	51588.00	51598	50332	96%
94	抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	51780.40	51791	50525	100%
130	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	51517.20	51527	50261	94%
129	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	51588.00	51598	50332	100%
27	抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	25878.40	25884	24618	16%
148	mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	52848.80(主); 51600.40(副)	52849	51597	95%

【０５５１】

図６に示すとおり、トラスツズマブ免疫コンジュゲート（Ａ）抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ

２－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３（配列番号１１２０）、（Ｂ）抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１１２２）、および（Ｃ）抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＥＦＩＡＳＫＬ－Ｎ３８９（配列番号１１２１）を、分析用サイズ排除クロマトグラフィー（ＡｎＳＥＣ）によってＳｈｏｄｅｘ　ＰＲＯＴＥＩＮ　ＫＷ－８０３カラムで分析した。３つの場合すべてで、ＡＤＣはモノマーであった（検出可能量の凝集物質はない）。

【実施例８】

【０５５２】

ペプチドタグがグラフトされている構築物の標識

単一ステップで、ｙｂｂＲタグがグラフトされているトラスツズマブ抗体とのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦのインビトロＳｆｐ触媒コンジュゲーションも試みた。ＩｇＧ１構築物抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｓ１９０Ｄ－Ｓ１９１－Ｓ１９２Ｌ－Ｌ１９３Ｅ－Ｇ１９４Ｆ－Ｔ１９５Ｉ－Ｑ１９６Ａ－Ｔ１９７Ｓ－Ｙ１９８Ｋ－Ｉ１９９Ｌ（配列番号１１４）のＳｆｐ触媒反応を実施例６において記載したとおりに行った。反応混合物のＨＰＬＣ（図７）およびＥＳＩ－ＭＳ分析によって、ＭＭＡＦとの免疫コンジュゲート（コンジュゲートの期待質量：５０４８９Ｄａ、未修飾抗体の期待質量：４９２２３Ｄａ、観察値：４９２１６．８Ｄａ）が形成されなかったことが示されている。他のグラフトされた構築物も反応に失敗し、免疫コンジュゲートの形成に失敗した。

【実施例９】

【０５５３】

混合グラフト／挿入構築物の標識

単一ステップで、Ｓ６タグまたはｙｂｂＲタグがグラフト／挿入されているトラスツズマブ抗体とのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦのインビトロＳｆｐ触媒コンジュゲーションも試みた。２種のトラスツズマブ変異体、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ６４Ｌ－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｋ６５（配列番号９９）および抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ－Ｓ７６Ｄ－Ｓ７７－Ｌ７８－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ７９（配列番号３０）を、実施例６において記載したとおりにＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦおよびＳｆｐと反応させた。抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ６４Ｌ－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｋ６５（配列番号９９）は、反応混合物（図８Ａ）のＨＰＬＣによって示されているとおりに、部分的に修飾されたが、抗ｈＨＥＲ２－ＬＣ－Ｓ７６Ｄ－Ｓ７７－Ｌ７８－ＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｑ７９（配列番号３０）（図８Ｂ）は、同一の条件下で反応に失敗した（表１１）。

【０５５４】

【表１１】

表11. 混合グラフト/挿入タグとのコンジュゲーション反応のESI-MS結果:

配列番号	抗体構築物(全抗体が検査され、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙されていない)	観察質量(Da)	免疫コンジュゲートの期待質量(Da)	未修飾抗体の期待質量(Da)	HPLCによるDAR=2
99	抗-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	51287.20	51297	50031	32%
30	抗-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	24324.80	25597	24331	0%

【実施例１０】

【０５５５】

蛍光色素での標識

酵素的抗体標識を細胞毒の部位特異的結合の他にも適用するために、本発明者らは、抗体－フルオロフォアコンジュゲートを生成するＳｆｐ触媒作用の実行可能性を実証する。

この実施例は、実施例６において記載したとおりに行われた、Ｓ６タグがグラフトまた挿入されているトラスツズマブ抗体とのＣｏＡ－テトラメチルローダミン（ＣｏＡ－ＴＭＲ）の２種のＳｆｐ触媒コンジュゲーションを表している。反応混合物のＨＰＬＣトレースを２８０ｎｍおよび５５５ｎｍの両方でモニタリングした（図９）。後者の波長は、ＴＭＲ色素の吸収最大（約５５０ｎｍ）に近い。さらに、抗体－フルオロフォアコンジュゲートの逆重畳積分質量スペクトルのデータを表１２にまとめる。

【０５５６】

切断グラフトされたＳ６タグを含有する抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｐ１８９Ｇ－Ｓ１９０Ｄ－Ｓ１９１－Ｓ１９２Ｌ－Ｌ１９３Ｓ－Ｇ１９４Ｗ－Ｔ１９５Ｌ（配列番号１０９）では、コンジュゲーションは結果として主に、抗体コンジュゲート１個あたり２色素の形成をもたらした（図９Ａ）。同様に、残基Ｔ３５９およびＫ３６０の間に挿入された全長Ｓ６タグを有する抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）は主に、各抗体に対して２個の色素分子のコンジュゲーションを示した（図９Ｂ）。結果は、Ｓ６タグを、修飾抗体の蛍光標識のコンジュゲーションのために使用することができることを例示している。

【０５５７】

【表１２】

表12. 蛍光色素とのコンジュゲーション反応のESI-MS結果:

配列番号	抗体構築物(全抗体が検査され、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙されていない)	観察質量(Da)	フルオロフォアコンジュゲートの期待質量(Da)	未修飾抗体の期待質量(Da)
109	抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	50177.20	50180	49286
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	51422.00	51419	50525

【実施例１１】

【０５５８】

チオエーテルまたは加水分解マレイミド連結を介して連結する細胞毒でのほぼ定量的な標識

本発明のコンジュゲートでは観察されないが、マレイミド連結したペイロードは、アルブミン、グルタチオン、およびシステインの反応性チオールとのマレイミド交換を介して血漿中で脱コンジュゲーションを受けることがある（Alleyら、Bioconjugate Chem. 2008、19、759～765）。マレイミドをベースとするコンジュゲートは、マレイミドカプロイル連結の化学的開環によって安定化することができる（Shenら、Nature Biotech. 30:184～189 (2012)を参照されたい）。この加水分解手順を検査するために、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）の個々のＡＤＣを、ＣｏＡ－開環－ＭＣ－ＭＭＡＦを使用して調製した。さらに、代替のチオール反応性化学反応を検査するために、本発明者らは、ＭＭＡＦ細胞毒をＣｏＡの末端チオールに、アセトアミドをベースとするチオエーテル連結を介して結合させ、結果としてＣｏＡ－Ａｃ－Ａｈｘ－ＭＭＡＦを生じさせた（Alleyら、Bioconj. Chem. 19:759-765(2008)を参照されたい）。これらの酵素的コンジュゲーション反応（実施例６に記載のプロトコルによる）のＥＳＩ－ＭＳおよびＨＰＬＣ結果を表１３にまとめる。ＤＡＲ＝２のほぼ定量的な標識が、ＣｏＡ－開環－ＭＣ－ＭＭＡＦ（図１０Ａ）と反応させた抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）およびＣｏＡ－Ａｃ－Ａｈｘ－ＭＣ－ＭＭＡＦ（図１０Ｂ）と反応させた抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）について観察された。

【０５５９】

【表１３】

表13. 代替リンカーとのコンジュゲーション反応のESI-MS結果:

抗体の配列番号(全抗体が検査され、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙されていない)	CoA基質	観察質量(Da)	免疫コンジュゲートの期待質量(Da)	未修飾抗体の期待質量(Da)	HPLCによるDAR=2
121	マレイミド-開環CoA-MC-MMAF	51802.00	51809	50525	85%
121	CoA-Ac-Ahx-MMAF	51742.40	51750	50525	80%

【実施例１２】

【０５６０】

切断可能なリンカーを用いての細胞毒でのほぼ定量的な標識

切断可能なリンカーを介して結合される細胞毒でのペプチドタグ付きＩｇＧの標識を実証するために、本発明者らは、カテプシンＢ感受性バリン－シトルリンリンカーを含有するＣｏＡ－ＭＣ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦを、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）（図１１Ａ）または抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）（図１１Ｂ）のいずれかと、Ｓｆｐが存在する状態でコンジュゲートした。この単一ステップの酵素的コンジュゲーションのＨＰＬＣおよびＥＳＩ－ＭＳ結果を表１４にまとめるが、これは、両方のタグ位置について、ＤＡＲ＝２のほぼ定量的な標識を示している。

【０５６１】

【表１４】

表14. CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAFとのコンジュゲーション反応のESI-MS結果:

配列番号	抗体構築物	観察質量(Da)	免疫コンジュゲートの期待質量(Da)	未修飾抗体の期待質量(Da)	HPLCによるDAR=2
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	52189.60	52196	50525	91%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	52188.40、51412.40	52196	50525	95%

【実施例１３】

【０５６２】

ｐＨの関数とした標識反応の最適化

この実験の目的は、ＣｏＡ基質とペプチドタグ付き抗体のＳｆｐ触媒コンジュゲーションのために最適なｐＨ範囲を決定することである。３つの実験において、２．５μＭの抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）または２．５μＭの抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）を１０μＭのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと、０．２５μＭのＳｆｐ（抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）で）または１．０μＭのＳｆｐ（抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）で）が存在する状態で反応させ、ｐＨをｐＨ５．０～１０．０で滴定した。このｐＨ範囲をカバーするために、５種の緩衝液を利用した：ｐＨ５．０では７５ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液；ｐＨ５．５、６．０、および６．５では７

５ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液；ｐＨ７．０、７．５、および８．０では７５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液；ｐＨ９．０では７５ｍＭホウ酸ナトリウム緩衝液；ｐＨ１０．０では７５ｍＭ炭酸ナトリウム緩衝液。すべての緩衝液に、１２．５ｍＭ　$MgCl_2$を補充して、酵素活性を保証した。一連のｐＨ滴定を２３℃にて２５～３５分間、各反応について１００μＬの体積で行った。４％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）３０μＬを添加することによって、酵素反応をクエンチした後に、反応混合物を、表１５にまとめるとおり、２８０ｎｍでのＨＰＬＣによって分析した。

【０５６３】

【表１５】

表15. pHの関数とした標識反応のHPLC結果:

配列番号	抗体構築物(全抗体が検査され、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙されていない)	pH値	DAR=0	DAR=1	DAR=2
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	5.0	100%; 100%	0%; 0%	0%; 0%
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		100%	0%	0%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	5.5	100%	0%	0%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	6.0	88%; 90%	12%; 10%	0%; 0%
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		100%	0%	0%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	6.5	68%	23%	9.2%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	7.0	25%; 26%	48%; 44%	28%; 31%
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		77%	23%	0%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	7.5	12%	41%	47%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	8.0	7.7%; 11%	36%; 36%	56%; 52%
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		52%	37%	11%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	9.0	12%	31 %	57%
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		32%	46%	23%
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	10.0	100%	0%	0%
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		53%	36%	11%

【０５６４】

ＨＰＬＣ結果は、８～９のｐＨ範囲が、ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦをペプチドタグ付きトラスツズマブとコンジュゲートするために最適であることを示している。このｐＨ範囲で、最低量の脱共役抗体（ＤＡＲ＝０）および最高量の二コンジュゲートＡＤＣ（ＤＡＲ＝２）をＨＰＬＣによって検出することができた。さらに、ｐＨに対して２のＤＡＲを有するＡＤＣのパーセンテージをプロットしたところ（図１２）、最適なｐＨは、検査された２つの部位について、Ｓ６タグの挿入部位から独立していることが示されている。

【実施例１４】

【０５６５】

酵素濃度の関数とした標識反応の最適化

効率的な酵素的コンジュゲーションに必要なＳｆｐの量を検査するために、２．５μＭの抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）を３７℃にて１６時間、５０μＭ　ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと共に、１０ｍＭ　$MgCl_2$を補充した５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）中で、Ｓｆｐ酵素が存在しない状態で、または０．１、０．２５、０．５、１、２．５、５、もしくは１０μＭ　Ｓｆｐ酵素が存在する状態でインキュベートした。１６時間後に、反応物のアリコットをＥＳＩ－ＭＳによって分析した。０．１μＭのＳｆｐ濃度では、主に非コンジュゲート修飾抗体が、ＥＳＩ－ＭＳによって検出され得る（図１３Ａ）。定量的コンジュゲーションは、０．２５μＭに等しい（図１３Ｂ）か、または０．５μＭのＳｆｐなどの０．２５μＭ超（図１３Ｃ）のすべてのＳｆｐ濃度について得られた。

【実施例１５】

【０５６６】

ＣｏＡ類似体の関数としての標識反応の最適化

ペプチドタグ付きＩｇＧ１抗体の定量的標識に必要であろうＣｏＡ基質の最少濃度を決定するために、２．５μＭ抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）を０．２５μＭまたは１．０μＭ　Ｓｆｐと共に、１２．５ｍＭ　$MgCl_2$を含有し、ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦを次の濃度：２．５、５、７．５、１０、１５、２５、および５０μＭで補充した７５ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ８．０）中でインキュベートした。反応を２３℃にて１３時間進行させ、次いで、４％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）３０μＬでクエンチした。ＨＰＬＣ分析（図１４Ａおよび１４Ｂ、表１６）によれば、ほぼ定量的な抗体コンジュゲーションが、７．５μＭ以上のすべてのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ濃度で達成された。標識度は、Ｓｆｐ濃度からはほぼ独立しており、ＤＡＲ２種の８６％は、０．２５μＭ　Ｓｆｐで観察され、ＤＡＲ２種の９２％は、１．０μＭ　Ｓｆｐで観察された。

【０５６７】

【表１６】

表 16. CoA 濃度の関数とした標識反応の HPLC 結果:

		保持時間		
		4.9 分	5.3 分	5.7 分
CoA-MC-MMAF(μM)	Sfp(μM)	DAR=0	DAR=1	DAR=2
50	0.25	3.8%	7.1%	89%
25	0.25	3.7%	7.0%	89%
15	0.25	3.2%	6.9%	90%
10	0.25	3.9%	7.2%	89%
7.5	0.25	5.0%	8.6%	86%
5	0.25	5.7%	20.5%	74%
2.5	0.25	28%	48.3%	24%
50	1.0	---	7.1%	93%
25	1.0	---	6.3%	94%
15	1.0	---	5.7%	94%
10	1.0	---	5.7%	94%
7.5	1.0	1.0%	6.7%	92%
5	1.0	2.8%	24%	73%
2.5	1.0	31%	48%	21%

【０５６８】

抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１２９）免疫コンジュゲートの凝集状態を決定するために、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）（２．５μＭ）５．６ｍｇを４０μＭ　ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦと、１μＭ　Ｓｆｐが存在する状態で、１０ｍＭ　$MgCl_2$を補充した５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．５）中で反応させた。２３℃で３日間インキュベートした後に、反応混合物をＳｅｐｈａｃｒｙｌ　１００－ＨＲサイズ排除カラム（Ｓｉｇｍａ）で精製した。ＥＳＩ－ＭＳによって定量的コンジュゲーションを確認した後に（観察質量５１７８６．４０Ｄａ；免疫コンジュゲートでの期待質量５１７９１Ｄａ；未修飾抗体の期待質量５０５２５Ｄａ）、個々のＡＤＣの四次構造をＴｒｉｃｏｒｎ　Ｓ２００カラム（Ａｇｉｌｅｎｔ）で分析した。ＡＤＣは主に、モノマー（９８％）であり、痕跡量のオリゴマー化種（２％）を含有した。

【実施例１６】

【０５６９】

Ｓ６抗体およびＡＤＣの熱安定性

ペプチドタグ付き免疫コンジュゲートの熱安定性を試験するために、精製ＡＤＣ試料を示差走査蛍光分析（ＤＳＦ）（表１７）または示差走査熱分析（ＤＳＣ）（表１８）によって測定した。試料を０．２５ｍｇ／ｍＬ（１．６７μＭ）の最終濃度まで、ＰＢＳ、ｐＨ７．４中で希釈した。ＤＳＦでは、ＳＹＰＲＯ　Ｏｒａｎｇｅゲル染色液（Ｓｉｇｍａ）を５倍の最終濃度まで、ＡＤＣの熱的アンフォールディングを示すためのトレーサーとして加えた。試料を蛍光スキャン２０回／度で、Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（Ｒｏｃｈｅ）装置中で加熱した。ＤＳＣでは、熱的アンフォールディングを、温度を１分あたり摂氏１度の速度で上昇させながらＭｉｃｒｏＣａｌ　ＶＰ－ＤＳＣ装置中で熱容量を測定することによってモニタリングした。３状態モデルを仮定する個々のコントローラソフトウェアパッケージを使用して、溶融温度を計算した。

【０５７０】

すでに記載されたとおり（Wakankarら、Bioconjugate Chem. 2010、21、1588～1595）、未修飾トラスツズマブは、２つの遷移を示す。遷移は、ＤＳＦによっては摂氏６９．７度および８１．１度で、ＤＳＣによっては摂氏７２．３度および８１．０度で観察された。未修飾抗体と同様に、程度は異なるものの、多くのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ免疫コンジュゲートが２つの遷移を示す（図１５）。熱融点のＤＳＦおよびＤＳＣ測定は十分に一致するが、ＤＳＦは、ほぼ２度低い第１遷移を報告する。一般に、多くの操作された非コンジュゲート抗体および個々のペプチドタグ付きＡＤＣは、野生型抗体である抗ｈＨＥＲ２と比較すると、ほとんど不安定化を示さない。

【０５７１】

【表１７】

表17. DSFによって測定された熱安定性。ΔTm値は、未修飾抗hHER2抗体に対するものである。

配列番号	試料(全抗体が検査され、名称はペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を表し、対の野生型鎖は列挙されていない)	Tm_1 / °C	Tm_2 / °C	ΔTm_1 / °C	ΔTm_2 / °C
93/25	抗-hHER2	69.7	81.2		
94	抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	70.8	---	1.1	---
95	抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	70.0	78.0	0.3	-3.1
102	抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	69.3	---	-0.4	---
103	抗-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	68.4	81.0	-1.3	-0.1
109	抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	69.6; 69.3	81.0; 80.6	-0.1; -0.4	-0.1; -0.5
110	抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	69.4	80.7	-0.3	-0.4
112	抗-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	69.4	78.6	-0.3	-2.5
113	抗-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	68.1	78.1	-1.7	-3.1
114	抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	67.8	---	-1.9	---
115	抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	67.1	---	-2.6	---
116	抗-hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K	69.3	---	-0.4	---
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	70.1; 70.3	81.7; 81.7	0.3; 0.5	0.6; 0.6
1117	抗-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.4; 68.6	81.5; 81.4	-1.3; -1.2	0.4; 0.3
122	抗-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	70.1	81.7	0.3	0.6
127	抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	66.6	81.5	-3.1	0.4
1118	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.3	81.0	-3.4	-0.1
1107	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.7	80.9	-3.0	-0.2
131	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	69.4	81.6	-0.3	0.5
130	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	68.9	81.5	-0.9	0.4
129	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	69.3	81.6	-0.4	0.5
135	抗-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	49.2	81.2	-20.6	0.1
141	抗-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	70.1	81.0	0.4	-0.1
27	抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	70.0	78.8	0.2	-2.3
29	抗-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	69.7	80.9	0.0	-0.2

【０５７２】

【表１８】

表18. DSCによって測定された熱安定性。ΔTm値は、未修飾抗hHER2抗体に対するものである。

配列番号(抗体)	試料	Tm1 / °C	Tm2 / °C	Tm3 / °C	ΔTm1 / °C	ΔTm2 / °C
93/25	抗-hHER2	72.3; 72.3	80.9; 81.0	---		
95	抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	72.3	77.9	83.3	0.1	-3.1
1120	抗-hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3	70.4	82.6	---	-1.9	1.7
102	抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	70.3	76.2	83.3	-2.0	-4.8
103	抗-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	69.7	80.5	---	-2.6	-0.5
109	抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	72.8; 70.7	80.1; 79.9	---	0.5; -1.6	-0.9; -1.1
110	抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	71.2	80.0	---	-1.1	-1.0
121	抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	70.4; 70.6	80.9; 80.6	---	-1.9; -1.6	-0.1; -0.4
1117	抗-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.7	80.6	---	-3.6	-0.4
1117	抗-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.8	80.4	---	-3.5	-0.6
122	抗-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	71.8	80.9	---	-0.5	-0.1
1118	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	67.0	80.2	---	-5.3	-0.8
1107	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.0	80.1	---	-6.3	-0.9
131	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	71.2	80.8	---	-1.0	-0.2
130	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	70.7	80.8	---	-1.6	-0.2
1121	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389	69.9	80.2	---	-2.3	-0.8
129	抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	71.1	80.8	---	-1.2	-0.2
1122	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	70.2	80.3	---	-2.1	-0.7
135	抗-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	---	81.0	---	---	0.1
141	抗-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	72.7	81.0	---	0.4	0.1
29	抗-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	71.6	81.1	---	-0.7	0.1

【実施例１７】

【０５７３】

ペプチドタグ付きＡＤＣの薬物動態特性

ＭＭＡＦペイロードを有する２種のペプチドタグ付きトラスツズマブＡＤＣ（２のＤＡＲ）のインビボ安定性をチェックするために、本発明者らは、薬物動態（ＰＫ）研究をマウスにおいて行った。抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１１７）および抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）を３匹のマウスに、１．０ｍｇ／ｋｇのＡＤＣ濃度を使用して静脈内注射した。１０の試料を０．２、１、３、７、２４、４８、９６、１６８、２４０、および３３６時間目に収集した。両方のＡＤＣの血漿力価を２週間まで、抗ヒトＩｇＧ、さらには抗Ｍ

ＭＡＦ抗体および切断ヒトＨＥＲ２（細胞外ドメイン３～４）をコーティングされたＥＬＩＳＡプレートを用いるＥＬＩＳＡアッセイを使用してモニタリングした。次いで、ＥＬＩＳＡ結果を未修飾トラスツズマブＩｇＧ１のＰＫ研究と比較した。抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１１７）が、未修飾トラスツズマブと比較して迅速な崩壊をマウスにおいて示した一方で、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）は、２週間にわたって、未修飾トラスツズマブと同様の血清クリアランスを示した（図１６）。両方のＡＤＣについて、抗ｈＩｇＧおよび抗ＭＭＡＦ力価は互いの跡をたどっていて、これは、マウスにおけるインビボ曝露の間に、もしあるとしても、薬物はほとんど失われないことを示唆している。

【実施例１８】

【０５７４】

ペプチドタグ付きＡＤＣのインビトロ効力

ペプチドタグ付きＡＤＣのインビトロ細胞殺滅アッセイをＨＥＲ２発現ＭＤＡ－２３１細胞系で実施した。ＤＡＲ＝２のＡＤＣを、実施例６において記載したとおりに、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１２１）および抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１２７）を切断不可能なＭＣ－ＭＭＡＦおよび切断可能なＭＣ－ＶａｌＣｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ（実施例１２）と反応させることによって調製した。対応するＡＤＣ、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１１７）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１１８）、抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｔ３５９－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＶａｌＣｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｋ３６０（配列番号１１０８）、および抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－ＶａｌＣｉｔ－ＰＡＢＣ－ＭＭＡＦ－ＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｎ３８９（配列番号１１０７）のインビトロ効力を、ＰＣ３－３１（高いＨＥＲ２のコピー数）およびＰＣ３（低いＨＥＲ２のコピー数）ＥｒｂＢ２操作細胞で検査した。ＰＣ３－３１細胞系に関して、すべてのペプチドタグ付きＡＤＣは、強力な細胞傷害性活性をピコモル範囲の５０％効果濃度（EC_{50}）で明示した。対照的に、ＰＣ３細胞での対応するEC_{50}値は、６０ｎＭよりも高かった。結果を表１９および図１７にまとめるが、これらは、４種のコンジュゲートすべてが高度に強力なＤＣであり、ＨＥＲ２／ｎｅｕ陽性細胞を抗原依存的に殺滅することを示している。

【０５７５】

【表１９】

表19. S6タグコンジュゲートMMAF免疫コンジュゲートのインビトロ効力

配列番号	ADC	EC_{50}値	
		PC3-31 細胞系	PC3 細胞系
1117	抗-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	7.9ng/mL; 53pM	>9,000ng/mL; >60nM
1118	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	8.5ng/mL; 57pM	>9,000ng/mL; >60nM
1108	抗-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	7.7ng/mL; 51pM	>9,000ng/mL; >60nM
1107	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	1.6ng/mL; 11pM	>9,000ng/mL; >60nM

【実施例１９】

【０５７６】

細胞培地中での細胞傷害性ＣｏＡ類似体でのペプチドタグ付きＩｇＧの標識

ＰＰＴアーゼ触媒４’－ホスホパンテテイニル化の生体直交性は、馴化培地などの複雑な混合物中でのペプチドタグ付きＩｇＧの部位特異的標識を可能にする。ペプチドタグ付き抗体の分泌の後に、外因的に加えられたＰＰＴアーゼ（Ｓｆｐなど）および薬物－Ｃｏ

Ａ基質（ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦなど）は、均一なＡＤＣの形成をもたらし、これは、タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーを使用する単一ステップで精製することができる。

【０５７７】

例えば、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞に、ＣＨ３ドメインにＳ６タグ挿入を有するＩｇＧ１重鎖をコードするプラスミドＤＮＡおよび未修飾κ軽鎖をコードするプラスミドＤＮＡを形質移入した。ＨＥＫ２９３Ｆ懸濁培養液４０ｍＬを３７℃にて５日間培養した。２０００ｒｐｍで１０分間遠心分離することによって採集した後に、培地上清に、４０μＭのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ、１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、および５０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）の最終濃度まで補充した。次いで、培地上清を２つの２０ｍＬアリコットに分けた。組換えによって産生されたＳｆｐ酵素（５μＭ）をアリコットの１つに添加し（表２０、実験＃２を参照されたい）、酵素反応を室温にて２４時間進行させた。

【０５７８】

【表２０－１】

表20. 培地中での標識スキーム

実験#	1	2
培地上清への CoA-MC-MMAF(40μM)の添加	X	X
培地上清への Sfp(5μM)の添加		X

【０５７９】

抗体精製を、床体積０．２５ｍＬを有するタンパク質Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムを使用して各実験について実施した。ＰＢＳで平衡化させた後に、培地上清をカラムに約１ｍＬ／分の流速で注入し、フロースルーを収集した。ＰＢＳ２０カラム体積で洗浄した後に、結合した抗体を０．１Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ３．０）６カラム体積を使用して溶離し、直後に、１Ｍトリス／ＨＣｌ（ｐＨ１０）で中和して、約８の最終ｐＨを達成した。溶離液の純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって評価し、抗体収量をブラッドフォード法によって決定した。最後に、Ｓｆｐ依存性培地中ＡＤＣ形成を、タンパク質Ａ溶離液のＥＳＩ－ＭＳおよびＨＰＬＣ分析によって確認した。

【実施例２０】

【０５８０】

アセチルＣｏＡでのペプチドタグ付きＩｇＧのインビトロ標識およびその後の細胞毒とのコンジュゲーション

アセチルＣｏＡによる免疫コンジュゲートの調製の原理は、３ステップ化学酵素的コンジュゲーションプロトコルであり、この際、アセチル部分は、ＣｏＡの反応性チオール基のための保護基として役立つ。さらに、ＳｆｐなどのＰＰＴアーゼは、触媒作用について、大きなＣｏＡ類似体（例えば、ペプチジル－ＣｏＡ）を許容するが、触媒効率（k_{cat}/K_M）は、ＣｏＡ自体と比較するとかなり低下する（Sieberら、J. Am. Chem. Soc.125: 10862～10866 (2003)を参照されたい）。したがって、小さなアセチル基が、天然ＣｏＡ基質で見られるのと同様の酵素の動態を保証すると予測される。

【０５８１】

例えば、ペプチドタグ付きＩｇＧ抗体とのアセチル化ｐｐａｎ部分の共有結合的コンジュゲーションを、実施例６において記載したとおりに、ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦの代わりにアセチルＣｏＡを使用して実施する。ＥＳＩ－ＭＳにより定量的コンジュゲーションを確認した後に、コンジュゲートを反応緩衝液（０．１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）に透析する。透析したコンジュゲートを約５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、０．５Ｍヒドロキシルアミンおよび２５ｍＭ　ＥＤＴＡを含む反応緩衝液（ｐＨ７．２）を含有する脱アセチル化溶液１０％（ｖ／ｖ）を補充する。この化学的チオエステル切断反応を室温にて３時間進行させ、続いて、反応混合物を、１０ｍＭ　ＥＤＴＡを補充

した反応緩衝液（ｐＨ７．２）に緩衝液交換する。ＥＳＩ－ＭＳにより定量的脱アセチル化を確認した後に、次いで、脱保護ｐｐａｎ部分を１５当量のチオール反応性マレイミド－ＭＣ－ＭＭＡＦ（０．５ｍＭ）と室温にて１時間コンジュゲートする。反応物を、ＰＢＳへの緩衝液交換によってクエンチする。最後に、定量的ＡＤＣ形成をＥＳＩ－ＭＳおよびＨＰＬＣ分析によって確認する。

【実施例２１】

【０５８２】

細胞培地中でのアセチルＣｏＡでのペプチドタグ付きＩｇＧの標識およびその後の細胞毒とのコンジュゲーション

均一なＡＤＣのＰＰＴアーゼ触媒生成の生体直交性により、細胞培地中でのＩｇＧでの部位特異的標識が可能である（実施例１９を参照されたい）。細胞傷害性薬物分子を抗体に直接的に結合させる代わりに、ＡＤＣ生成のためのアセチルＣｏＡでの培地中標識を、３ステップ化学酵素的コンジュゲーションプロセスによって実施することも可能である。小さなアセチルＣｏＡ類似体は、大きな細胞傷害性ＣｏＡ類似体と比較すると改善された触媒効率（k_{cat}/K_M）でコンジュゲーション反応を可能にし、それによって、定量的コンジュゲーションのために必要な酵素量をかなり減らすことを可能にする。さらに、プロセスの開発のために、標識反応を大きな培養体積で非毒性化合物と共に行うことが有利であろう。アセチル－ｐｐａｎ部分とコンジュゲートしたペプチドタグ付きＩｇＧは、タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーを使用する単一ステップで精製することができる。精製アセチル－ｐｐａｎ－コンジュゲート抗体から出発して免疫コンジュゲートを調製するために、その後の２つの化学反応を実施例２０において記載したとおりに実施する。

【実施例２２】

【０５８３】

細胞培地中でのアセチルＣｏＡまたは生体直交性ＣｏＡ類似体でのペプチドタグ付きＩｇＧの標識およびその後の細胞毒とのコンジュゲーション

均一なＡＤＣのＰＰＴアーゼ触媒生成の生体直交性により、細胞培地中でのＩｇＧの部位特異的標識も可能である（実施例１９を参照されたい）。細胞傷害性薬物分子を抗体に直接的に結合させる代わりに、ＡＤＣ生成のためのアセチルＣｏＡでの培地中標識を、３ステップ化学酵素的コンジュゲーションプロセスによって実施することも可能である。小さなアセチルＣｏＡ類似体は、大きな細胞傷害性ＣｏＡ類似体と比較すると改善された触媒効率（k_{cat}/K_M）でコンジュゲーション反応を可能にし、それによって、定量的コンジュゲーションのために必要な酵素量をかなり減らすことを可能にする。さらに、プロセスの開発のために、標識反応を大きな培養体積で非毒性化合物と共に行うことが有利であろう。アセチル－ｐｐａｎ部分とコンジュゲートしたペプチドタグ付きＩｇＧは、タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーを使用する単一ステップで精製することができる。精製アセチル－ｐｐａｎ－コンジュゲート抗体から出発して免疫コンジュゲートを調製するために、その後の２つの化学反応を実施例２０において記載したとおりに実施する。

【０５８４】

別法では、アセチルＣｏＡを使用する代わりに、培地中標識を、アジド、アルケン、アルキン、ケトン、またはアルデヒド部分などの生体直交性基に共有結合しているＣｏＡ類似体で行うこともできる。培地中ＰＰＴアーゼ触媒作用の後に、ｐｐａｎ結合した生体直交性基を有するペプチドタグ付き抗体を、タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーを使用して均一に精製する。ＡＤＣ調製のためのこの２ステップ化学酵素的標識戦略の最後のステップとして、相補的生体直交性基と反応させることは、抗体への薬物部分の部位特異的結合につながる。図２２は、カルボニル官能化されたＣｏＡ類似体をＡ１タグ付き抗体と部位特異的に結合させ、続いて、末端基（ＴＧ）のオキシムライゲーションを行うための２ステップ法を例示している。細胞培地中で第１ステップを行った後に、生じたカルボニル官能化された抗体をタンパク質Ａアフィニティー精製によって精製する。次い

で、第２ステップは、ｐｐａｎ連結カルボニル基をアミノオキシ誘導体化ＴＧと反応させることを伴う。反応の後に、過剰のＴＧを透析または緩衝液交換によって除去する。カルボニル官能化されたＣｏＡ類似体（ケトンＣｏＡ）の合成は、実施例２３に記載する。

【実施例２３】

【０５８５】

ケトンＣｏＡの合成

２５ｍＭ　ＣｏＡ－ＳＨ水溶液（２０μｍｏｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）７８４μＬを、１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．１）９．０ｍＬに加えた。メチルビニルケトン（３０μｍｏｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）をH_2O中で１０倍に希釈した後に、結果として生じた水溶液２５μＬを２ｎＭ　ＣｏＡ－ＳＨ溶液に加えた。反応混合物を室温にて１時間振盪した。反応物を液体窒素中でクエンチし、－８０℃で貯蔵した。

【０５８６】

反応混合物を粒径５μｍおよび１０×１００ｍｍ寸法のＳｕｎＦｉｒｅ　Ｐｒｅｐ　C_{18}カラム（Ｗａｔｅｒｓ）で精製した。反応混合物４～６ｍＬを注入した後に、０．１％（ｖ／ｖ）ＴＦＡ／水（Ａ）と０．１％（ｖ／ｖ）ＴＦＡ／アセトニトリル（Ｂ）との間の次の勾配を５ｍＬ／分の流速で適用した。

【０５８７】

【表２０－２】

時間(分)	%B
0	5
5	5
30	100

ＨＰＬＣ精製されたケトンＣｏＡをＬＣ－ＭＳによって確認した。$C_{25}H_{43}N_7O_{17}P_3S$でのＥＳＩ－ＭＳ計算値［ＭＨ］$^+$：８３８．２；観察値：８３８．１。所望の生成物を凍結乾燥させると、ケトンＣｏＡ２．９３ｍｇ（３．５μｍｏｌ）が収率１８％で得られた。

【実施例２４】

【０５８８】

４のＤＡＲを有するＡＤＣの生成および特性

４のＤＡＲを有するＡＤＣは、同じ酵素の基質である複数のペプチドタグを１個の抗体に挿入／グラフトすることによって生成することができる（図１９Ａ）。例えば、ｙｂｂＲタグおよびＳ６タグは両方とも、ＰＰＴアーゼＳｆｐによって基質として認識される。逆に、複数の異なるリガンドでの抗体の標識は、２種の異なるＰＰＴアーゼの基質であるペプチドタグを１個の抗体に挿入／グラフトすることによって達成される。例えば、Ａ１タグは、ＡｃｐＳ　ＰＰＴアーゼによって専ら認識されるが、Ｓ６タグは、Ｓｆｐ　ＰＰＴアーゼによって優先的に修飾される。さらに、より高いＤＡＲ（例えば、６、８、１０、１２などのＤＡＲ）を有する免疫コンジュゲートを、追加のタグを加えることによって生成することができる。酵素的コンジュゲーションを、システイン、ピロリシン、ピロリン－カルボキシ－リシン、および非天然アミノ酸を介する部位特異的コンジュゲーション、さらにはＬｙｓ、Ｃｙｓ、またはＴｙｒ選択的化学反応などの化学選択的方法などの他の標識戦略と組み合わせることもできる。

【０５８９】

４のＤＡＲを有する均一なＡＤＣを調製するために、２個のペプチドタグを、トラスツズマブＩｇＧ１の重鎖に、すなわち、１個のＳ６タグをV_Hドメインに、かつ１個のｙｂ

ｂＲタグをＣＨ３ドメインに組み込んだ（抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３－Ｅ３８８－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１４２））。この二重タグ付き抗体をＨＥＫ２９３Ｆ細胞中で５０ｍＬスケールで発現させた。形質移入の後に、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞を５日間培養し、その後、３４００ｒｐｍで１５分間遠心分離することによって採集した。結果として生じた培地上清を、０．２２μｍ細孔サイズフィルターで濾過した。精製を、床体積０．６ｍＬを有し、ＰＢＳ２０カラム体積で平衡化させておいたタンパク質Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して達成した。濾過した培地上清を約１ｍＬ／分の流速で負荷した。ＰＢＳ２０カラム体積でカラムを洗浄した後に、ペプチドタグ付き抗体を０．１Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ３．０）５カラム体積で溶離し、直後に、１Ｍトリス／ＨＣｌ（ｐＨ１０）で約８の最終ｐＨまで中和した。ブラッドフォード法に従うと、全収量は、培養液１リットルあたり精製抗体８ｍｇであった。抗体構築物の純度をＳＤＳ－ゲル電気泳動によって評価した。３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔで濃縮した後に、２．５μＭ抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｖ２－ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ－Ｑ３－Ｅ３８８－ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１４２）を５０μＭ　ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ、１μＭ　Ｓｆｐ、１２．５ｍＭ　$MgCl_2$と共に、７５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液、ｐＨ７．５中、２３℃にて１６時間インキュベートして、二重タグ付き抗体を４個の薬物分子で酵素的標識した。

【０５９０】

還元および脱グリコシル化抗体構築物の逆重畳積分質量スペクトルによって、２個のｐｐａｎ－ＭＣ－ＭＭＡＦユニットがトラスツズマブの各重鎖に共有結合していることが確認された（観察質量５４２２３．２０Ｄａ；期待質量５４２３１Ｄａ）。脱共役種（期待質量５１７００Ｄａ）も一標識種（期待質量５２９６６Ｄａ）も、ＥＳＩ－ＭＳによって観察されなかった。４のＤＡＲを有するＡＤＣへのほぼ定量的な変換（ピーク面積積算によれば９５％）がＨＰＬＣ分析によってさらに確認された（図１９Ｂ）。

【実施例２５】

【０５９１】

タンパク質発現および精製プラットフォーム（ＰＥＰＰ）を使用してのペプチドタグ付きＡＤＣの包括的なライブラリの生成

ヒトＩｇＧ１　Ｂ１２抗体の結晶構造の試験および表面アクセス性計算（実施例１）に基づき、２６８種のペプチドタグ付きトラスツズマブＩｇＧ１構築物からなるライブラリが提案された。定常領域へのＳ６およびｙｂｂＲタグ配列の体系的な挿入を、表８に列挙したオリゴヌクレオチドを使用する標準的な分子生物学的方法によって達成した。ＰＥＩ法（Meissnerら、2001）に従って、トラスツズマブの重鎖また軽鎖遺伝子のいずれかを有する配列確認されたプラスミドを使用して、２９３　Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）細胞に過渡的同時形質移入した。Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）３５ｍＬの体積中、３７℃にて、５％CO_2下での５日間の各ライブラリメンバーの培養をＰＥＰＰシステムで実施した（Gonzalez R、Jennings LL、Knuth M、Orth AP、Klock HE、Ou W、Feuerhelm J、Hull MV、Koesema E、Wang Y、Zhang J、Wu C、Cho CY、Su AI、Batalov S、Chen H、Johnson K、Laffitte B、Nguyen DG、Snyder EY、Schultz PG、Harris JL、Lesley SA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010、107(8):3552～7）。自動細胞採集の後に、同じシステムを使用して、ペプチドタグ付き抗体のライブラリをタンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。簡単には、培地上清の０．２２μｍ濾過の後に、各濾液を、沈降樹脂０．２ｍＬを含有するタンパク質Ａアフィニティーカラムにほぼ１ｍＬ／分の流速で負荷した。次いで、カラムをＰＢＳ２０カラム体積で洗浄し、続いて、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ３．０の５カラム体積で溶離した。すぐに、溶離液を１Ｍトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）２５％（ｖ／ｖ）で中和した。

【０５９２】

タンパク質Ａ精製抗体の収量を決定するために（表２１）、溶離液のタンパク質濃度をＮＤ－１０００　ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計（ＮａｎｏＤｒｏｐ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ

ｓ）で２８０ｎｍで、ＩｇＧ分子について事前設定されたモル吸光係数を使用して二重に測定した。ペプチドタグ付き抗体を、３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５遠心濾過デバイス（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した後に、酵素触媒コンジュゲーション反応を、２０℃にて約１６時間、２．５μＭのペプチドタグ付き抗体、２０μＭのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質、および１μＭのＳｆｐ酵素で、１２．５ｍＭの$MgCl_2$および２０ｍＭのＮａＣｌを補充したトリス－ＨＣｌ緩衝液（７５ｍＭ、ｐＨ８．０）中で行った。ペプチドタグ付き抗体の標識度を、分析用ＨＰＬＣによってＰＬＲＰ－Ｓカラム（４０００Å、５μＭ、５０×４．６ｍｍ、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で、０．１％トリフルオロ酢酸を含有する水中で２５～５０％アセトニトリルの６分の直線勾配で定量化した。対応する脱共役抗体を陰性対照として使用した（表２１）。Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－４遠心濾過デバイス（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して抗体コンジュゲートを濃縮した後に、酵素反応を、Ａｇｉｌｅｎｔ　６５２０　Ｑ－ＴＯＦ装置（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）での質量分析法によってさらに分析した。還元および脱グリコシル化抗体コンジュゲートの逆重畳積分ＥＳＩ－ＭＳスペクトルを、濃縮反応混合物１０μＬを使用することによって得た（表２１）。

【０５９３】

ペプチドタグ付きＡＤＣ構築物をＮｉ－ＮＴＡ（ニッケル－ニトリロ三酢酸）クロマトグラフィーによってさらに精製して、Ｓｆｐ酵素および過剰のＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質を除去した。Ｎｉ－ＮＴＡカラム（それぞれ床体積０．２ｍＬ）をＰＢＳで平衡化させた後に、濃縮したコンジュゲーション試料をカラムに、ほぼ１ｍＬ／分の流速で負荷した。次に、カラムをＰＢＳ２０カラム体積で洗浄し、続いて、２５０ｍＭイミダゾールおよび３００ｍＭ　ＮａＣｌを補充したトリス－ＨＣｌ緩衝液（５０ｍＭ、ｐＨ８．０）５カラム体積で溶離した。ブラッドフォードアッセイによると、ペプチドタグ付きＡＤＣの回収率は、タンパク質Ａ精製出発物質の３９％と平均された。次いで、ＰＥＰＰシステムを使用して、ＮＡＰ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用することで各試料をＰＢＳに緩衝液交換した。緩衝液交換の後に、ペプチドタグ付きＡＤＣを、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－４遠心濾過デバイス（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮し、コンジュゲートの濃度を、ＰＢＳでの希釈によって調整した。適切な濃度に調整したら、ＡＤＣ試料をＤＳＦ（示差走査蛍光分析）、ＬＣ９０（ＬａｂＣｈｉｐ９０）、ＡｎＳＥＣ（分析用サイズ排除クロマトグラフィー）、およびインビトロ効力アッセイ（データは図示せず）によってさらに特徴付けた。

【０５９４】

元々計画された２６８種のペプチドタグ付きトラスツズマブ抗体のうち、発現を１８３種の構築物について検査した（６８％）。発現レベルは、培養液１リットルあたり抗体０～３０ｍｇ超の範囲の大きな変動性を示し（表２１）、平均は、培養液１リットルあたり抗体１６ｍｇ（±８ｍｇ標準偏差）である。さらに、発現レベルは、ペプチドタグ挿入の位置と相関しており、４６種の軽鎖構築物（培養液１リットルあたり１３±８ｍｇ）が、１３７種の重鎖構築物（培養液１リットルあたり１７±８ｍｇ）よりも低い平均発現レベルを示している。発現レベルは、ペプチドタグの種類にも依存しており：ｙｂｂＲタグ挿入を有する９５種の抗体構築物は平均して、Ｓ６タグ挿入を有する対応する８８種の構築物（培養液１リットルあたり１３±８ｍｇ）よりも高い発現レベル（培養液１リットルあたり１９±７ｍｇ）を示す。逆の傾向が、逆相ＨＰＬＣ分析に基づくコンジュゲーション効率について観察される：ほぼ定量的なＡＤＣ形成（薬物－対－抗体比≧１．９）を示す４４種（７２％）のペプチドタグ付き構築物は、Ｓ６ペプチド配列の挿入に基づく一方で、１７種（２８％）のｙｂｂＲタグ付き抗体しか、対応するＡＤＣへのほぼ定量的な変換を示さなかった。

【０５９５】

平均すると、重鎖構築物は、軽鎖でのペプチド挿入よりも効率的にコンジュゲートした：軽鎖にペプチドタグ挿入を有する構築物のうちの１９％（４３種のうちの８種）は少な

くとも１．９のＤＡＲを示したが、重鎖にペプチドタグ挿入を有する構築物のうちの４０％（１３１種のうちの５３種）は、同じ効率でコンジュゲートし得た。最良の全体コンジュゲーション効率は、ＣＨ１ドメインの複数のループ領域でのペプチドタグ挿入によって示される。総じて、１８３種の発現ペプチドタグ付き抗体のうち、１７４種の構築物のコンジュゲーション効率が決定され得、６１種（３５％）の構築物が１．９以上の薬物－対－抗体比（ＤＡＲ）をもたらした。

【０５９６】

結果として生じたＡＤＣの熱安定性は、ペプチドタグ挿入の部位に依存する。例えば、実施例２６において詳細に例示するとおり、ＣＨ２ドメインでの多くのペプチドタグ挿入は、ＤＳＦ（示差走査蛍光分析）測定によると、最低観察熱遷移（Ｔｍ１）のかなりの低下につながる。分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって試験された１５６種のペプチドタグ付きＡＤＣのうちの１３５種（８７％）では、凝集または抗体オリゴマーはほとんど観察されなかった（≧９０％モノマー種）。ペプチドタグ付きＡＤＣのインビトロ効力は、期待されたとおり、それらの標識度と相関した。好ましい特性を有する多数のペプチドタグ付きＡＤＣを生成することができるが、データも、発現収量、熱安定性、コンジュゲーション効率、および他の特性が、タグ挿入部位の選択によって多大な影響を受けることを説明している。

【０５９７】

【表２１－１】
表21．ADC調製およびPEPPシステムでの調製された物質の特徴付け

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	DAR[c]	抗体の期待質量[d] (Da)	ADCの期待質量[e] (Da)	観察質量[f] (Da)
配列番号150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	配列番号1136	10	2.0	50525.0	51790.5	51792.7 51814.6
配列番号151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	配列番号1137	12	2.0	50525.0	51790.5	51792.4
配列番号152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	配列番号1138	11	2.0	50525.0	51790.5	51797.2
配列番号157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	配列番号1139	24	2.0	50525.0	51790.5	51792.8
配列番号158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	配列番号1140	20	2.0	50525.0	51790.5	51792.0
配列番号160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	配列番号1141	14	2.0	50525.0	51790.5	51792.3 51814.6
配列番号161	抗-hHER2-HC-E152-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P153	配列番号1142	3	0.2	50525.0	51790.5	50528.4 51794.8
配列番号162	抗-hHER2-HC-P153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V154	配列番号1143	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
配列番号163	抗-hHER2-HC-N159-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S160	配列番号1144	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
配列番号164	抗-hHER2-HC-S160-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G161	配列番号1145	10	1.4	50525.0	51790.5	51792.0
配列番号165	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A162	配列番号1146	9	1.3	50525.0	51790.5	51798.0 50529.2

【表２１－２】

配列番号166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	配列番号1147	15	2.0	50525.0	51790.5	51798.4
配列番号168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	配列番号1148	22	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
配列番号169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	配列番号1149	15	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
配列番号170	抗-hHER2-HC-P171-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A172	配列番号1150	3	N/A	50525.0	51790.5	N/A
配列番号171	抗-hHER2-HC-S176-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S177	配列番号1151	8	1.9	50525.0	51790.5	51791.7 51812.9
配列番号173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	配列番号1152	24	1.5	50525.0	51790.5	51792.4
配列番号175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	配列番号1153	21	2.0	50525.0	51790.5	51792.0 51814.0
配列番号176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	配列番号1154	32	2.0	50525.0	51790.5	51792.0 51813.7
配列番号177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	配列番号1155	18	2.0	50525.0	51790.5	51791.0
配列番号178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	配列番号1156	19	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
配列番号179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	配列番号1157	17	2.0	50525.0	51790.5	51800.0 53918.8
配列番号180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	配列番号1158	23	1.9	50525.0	51790.5	51791.9 51813.5
配列番号181	抗-hHER2-HC-K205-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P206	配列番号1159	22	0.2	50525.0	51790.5	50526.7 51792.6 50548.6
配列番号182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	配列番号1160	25	1.9	50525.0	51790.5	51792.1 51813.9
配列番号185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	配列番号1161	35	2.0	50525.0	51790.5	51789.5 51810.4
配列番号187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	配列番号1162	13	1.9	50525.0	51790.5	51789.5 51770.4 51809.6
配列番号189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	配列番号1163	16	1.9	50525.0	51790.5	51790.1 51811.8

【表２１－３】

配列番号191	抗-hHER2-HC-P244-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P245	配列番号1164	12	0.8	50525.0	51790.5	50522.7 51790.6 50545.4
配列番号193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	配列番号1165	23	1.9	50525.0	51790.5	51789.0 51809.6
配列番号194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	配列番号1166	20	2.0	50525.0	51790.5	51789.5 51810.5
配列番号195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	配列番号1167	25	2.0	50525.0	51790.5	51792.2 51814.5
配列番号198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	配列番号1168	20	2.0	50525.0	51790.5	51789.2 51810.1
配列番号199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	配列番号1169	10	2.0	50525.0	51790.5	51789.6 51810.0
配列番号200	抗-hHER2-HC-E269-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-D270	配列番号1170	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
配列番号201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	配列番号1171	18	2.0	50525.0	51790.5	51789.8 51771.0 51811.2
配列番号202	抗-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	配列番号1172	8	2.0	50525.0	51790.5	51796.4
配列番号206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	配列番号1173	23	1.8	50525.0	51790.5	51789.8 51811.3
配列番号207	抗-hHER2-HC-T307-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V308	配列番号1174	4	n.d.	50525.0	51790.5	51793.6 50526.4
配列番号209	抗-hHER2-HC-L309-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H310	配列番号1175	10	n.d.	50525.0	51790.5	51795.6 50530.8
配列番号211	抗-hHER2-HC-N315-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G316	配列番号1176	13	0.9	50525.0	51790.5	51788.9 50523.3 51810.4
配列番号212	抗-hHER2-HC-G316-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K317	配列番号1177	7	0.8	50525.0	51790.5	50524.1 51789.7 50545.9
配列番号215	抗-hHER2-HC-A327-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L328	配列番号1178	14	0.5	50525.0	51790.5	51789.9 50522.7
配列番号216	抗-hHER2-HC-L328-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P329	配列番号1179	16	1.0	50525.0	51790.5	51789.8 50523.2 51810.9
配列番号217	抗-hHER2-HC-P329-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A330	配列番号1180	18	1.5	50525.0	51790.5	51790.1 51811.9

【表２１－４】

配列番号218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	配列番号1181	9	1.7	50525.0	51790.5	51792.4 50527.6
配列番号220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	配列番号1182	6	1.8	50525.0	51790.5	51792.4 51604.8
配列番号221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	配列番号1183	26	1.9	50525.0	51790.5	51790.0
配列番号222	抗-hHER2-HC-Q342-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P343	配列番号1184	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
配列番号223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	配列番号1185	14	2.0	50525.0	51790.5	51792.2 51809.3
配列番号224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	配列番号1186	16	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
配列番号229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	配列番号1187	26	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
配列番号230	抗-hHER2-HC-N384-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G385	配列番号1188	2	2.0	50525.0	51790.5	51792.8
配列番号127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	配列番号1118	23	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
配列番号232	抗-hHER2-HC-T394-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P395	配列番号1189	3	0.7	50525.0	51790.5	51793.2 50525.2
配列番号233	抗-hHER2-HC-P395-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P396	配列番号1190	4	n.d.	50525.0	51790.5	51794.6 51773.9 51820.4
配列番号235	抗-hHER2-HC-D401-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G402	配列番号1191	10	0.2	50525.0	51790.5	51793.7 51818.2
配列番号236	抗-hHER2-HC-S415-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R416	配列番号1192	5	1.1	50525.0	51790.5	51792.8 50526.8
配列番号237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	配列番号1193	5	1.7	50525.0	51790.5	51794.1
配列番号238	抗-hHER2-HC-W417-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q418	配列番号1194	15	1.4	50525.0	51790.5	51798.8 51921.6[g]
配列番号239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	配列番号1195	9	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
配列番号243	抗-hHER2-HC-H433-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N434	配列番号1196	5	2.0	50525.0	51790.5	51793.6 51922.4[g] 51735.6

【表２１－５】

配列番号244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	配列番号1197	20	2.0	50525.0	51790.5	51797.6 51923.6[g]
配列番号246	抗-hHER2-HC-L443-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S444	配列番号1198	24	0.0	50525.0	51790.5	50527.2 50547.1
配列番号248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	配列番号1199	10	2.0	50525.0	51790.5	51786.8 51915.6[g] 51729.6
配列番号249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	配列番号1200	18	1.5	50331.8	51597.3	51598.4 51618.3
配列番号250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	配列番号1201	15	1.6	50331.8	51597.3	51602.4
配列番号251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	配列番号1202	27	2.0	50331.8	51597.3	51600.8
配列番号257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	配列番号1203	19	2.0	50331.8	51597.3	51603.2
配列番号259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	配列番号1204	21	2.0	50331.8	51597.3	51601.6
配列番号261	抗-hHER2-HC-P153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V154	配列番号1205	15	0.1	50331.8	51597.3	50339.6
配列番号262	抗-hHER2-HC-N159-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S160	配列番号1206	13	n.d.[f]	50331.8	51597.3	50334.4 51600.4
配列番号265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	配列番号1207	16	1.7	50331.8	51597.3	51598.3 51618.5
配列番号267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	配列番号1208	18	1.2	50331.8	51597.3	51597.7 51616.8
配列番号268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	配列番号1209	23	1.9	50331.8	51597.3	51595.2
配列番号269	抗-hHER2-HC-P171-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A172	配列番号1210	15	1.0	50331.8	51597.3	50332.9 50353.8
配列番号270	抗-hHER2-HC-S176-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S177	配列番号1211	13	0.1	50331.8	51597.3	50333.0 50354.0
配列番号273	抗-hHER2-HC-S190-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S191	配列番号1212	23	0.2	50331.8	51597.3	50333.6 51600.8
配列番号274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	配列番号1213	24	1.6	50331.8	51597.3	51598.9 51620.3

【表２１－６】

配列番号275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	配列番号1214	21	2.0	50331.8	51597.3	51598.4 51618.8
配列番号277	抗-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	配列番号1215	14	1.6	50331.8	51597.3	51599.2
配列番号278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	配列番号1216	14	1.9	50331.8	51597.3	51599.0 51617.2
配列番号279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	配列番号1217	21	2.0	50331.8	51597.3	51598.1 51618.7
配列番号280	抗-hHER2-HC-K205-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P206	配列番号1218	24	0.0	50331.8	51597.3	50327.6
配列番号281	抗-hHER2-HC-P206-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S207	配列番号1219	23	0.0	50331.8	51597.3	50333.3 50354.7
配列番号286	抗-hHER2-HC-E233-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L234	配列番号1220	28	0.6	50331.8	51597.3	50330.8 51596.6 51615.6
配列番号288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	配列番号1221	24	2.0	50331.8	51597.3	51596.7 51617.5
配列番号289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	配列番号1222	22	1.3	50331.8	51597.3	51598.8 51620.7
配列番号290	抗-hHER2-HC-P244-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P245	配列番号1223	8	1.4	50331.8	51597.3	51596.8 51614.6
配列番号291	抗-hHER2-HC-P245-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K246	配列番号1224	22	1.0	50331.8	51597.3	50330.6 51595.9 50351.5
配列番号292	抗-hHER2-HC-I253-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S254	配列番号1225	0	N/A	50331.8	51597.3	N/A
配列番号293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	配列番号1226	24	1.9	50331.8	51597.3	51596.6 51616.8
配列番号294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	配列番号1227	21	2.0	50331.8	51597.3	51596.3 51616.5
配列番号296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	配列番号1228	22	1.9	50331.8	51597.3	51596.3 51616.1
配列番号297	抗-hHER2-HC-S267-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H268	配列番号1229	23	0.2	50331.8	51597.3	51596.0 50330.9 51615.6
配列番号298	抗-hHER2-HC-H268-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E269	配列番号1230	22	0.7	50331.8	51597.3	51596.2 50331.0 51616.8

【表２１－７】

配列番号299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	配列番号1231	17	1.8	50331.8	51597.3	51598.7 51620.0
配列番号300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	配列番号1232	26	1.3	50331.8	51597.3	51596.4 51616.5
配列番号301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	配列番号1233	22	1.7	50331.8	51597.3	51595.9 51615.4
配列番号302	抗-hHER2-HC-D280-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G281	配列番号1234	4	0.7	50331.8	51597.3	50330.8 51596.3 50351.7
配列番号303	抗-hHER2-HC-H285-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N286	配列番号1235	25	0.0	50331.8	51597.3	50331.0 50352.7
配列番号304	抗-hHER2-HC-N286-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A287	配列番号1236	20	0.0	50331.8	51597.3	50332.0 50354.1
配列番号305	抗-hHER2-HC-P291-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R292	配列番号1237	21	0.5	50331.8	51597.3	50333.5 51598.8 51620.0
配列番号310	抗-hHER2-HC-N315-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G316	配列番号1238	15	n.d.	50331.8	51597.3	50331.5 51596.8 50353.1
配列番号311	抗-hHER2-HC-G316-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K317	配列番号1239	9	1.1	50331.8	51597.3	51596.6 50331.0 51614.0
配列番号312	抗-hHER2-HC-K317-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E318	配列番号1240	10	0.8	50331.8	51597.3	50330.9 51596.3 50352.1
配列番号313	抗-hHER2-HC-K326-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A327	配列番号1241	15	0.0	50331.8	51597.3	50330.8 51597.2
配列番号314	抗-hHER2-HC-A327-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L328	配列番号1242	25	0.1	50331.8	51597.3	50333.6 50355.1
配列番号315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	配列番号1243	13	1.9	50331.8	51597.3	51598.8
配列番号316	抗-hHER2-HC-P329-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A330	配列番号1244	7	0.9	50331.8	51597.3	51601.6 50334.8
配列番号317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	配列番号1245	25	1.8	50331.8	51597.3	51602.4
配列番号318	抗-hHER2-HC-A339-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K340	配列番号1246	25	0.0	50331.8	51597.3	50333.6
配列番号319	抗-hHER2-HC-K340-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G341	配列番号1247	27	0.4	50331.8	51597.3	51600.4 50333.2

【表２１－８】

配列番号320	抗-hHER2-HC-G341-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q342	配列番号1248	25	0.2	50331.8	51597.3	51599.9 50334.7
配列番号321	抗-hHER2-HC-Q342-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P343	配列番号1249	28	0.8	50331.8	51597.3	51599.8 50334.5
配列番号322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	配列番号1250	24	1.9	50331.8	51597.3	51599.1 51615.8
配列番号323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	配列番号1251	29	1.9	50331.8	51597.3	51600.1 51616.6
配列番号325	抗-hHER2-HC-E356-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E357	配列番号1252	20	0.8	50331.8	51597.3	51600.8 50335.1 51616.8
配列番号327	抗-hHER2-HC-M358-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T359	配列番号1253	26	0.2	50331.8	51597.3	50333.9 51599.4
配列番号328	抗-hHER2-HC-K360-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N361	配列番号1254	24	0.6	50331.8	51597.3	51599.9 51615.1
配列番号329	抗-hHER2-HC-N384-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G385	配列番号1255	24	0.0	50331.8	51597.3	50334.3 50354.2
配列番号129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	配列番号1122	21	1.9	50331.8	51597.3	51601.2
配列番号330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	配列番号1256	25	1.6	50331.8	51597.3	51600.1 51620.9
配列番号332	抗-hHER2-HC-P395-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P396	配列番号1257	25	0.0	50331.8	51597.3	50334.4 50352.8
配列番号333	抗-hHER2-HC-D399-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S400	配列番号1258	11	0.0	50331.8	51597.3	50335.1 50353.6
配列番号335	抗-hHER2-HC-D401-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G402	配列番号1259	23	0.0	50331.8	51597.3	50334.9 50353.0
配列番号336	抗-hHER2-HC-S415-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R416	配列番号1260	21	0.2	50331.8	51597.3	50335.0 51600.5
配列番号337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	配列番号1261	15	1.9	50331.8	51597.3	51599.9 51615.8
配列番号338	抗-hHER2-HC-W417-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q418	配列番号1262	9	0.2	50331.8	51597.3	50334.8 51599.9 50353.4
配列番号339	抗-hHER2-HC-Q418-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q419	配列番号1263	22	0.5	50331.8	51597.3	51600.5 50335.2 51616.7

【表２１－９】

配列番号340	抗-hHER2-HC-Q419-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G420	配列番号1264	21	0.8	50331.8	51597.3	51600.0 51616.5
配列番号341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	配列番号1265	22	1.1	50331.8	51597.3	51599.5 51616.0
配列番号342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	配列番号1266	24	1.4	50331.8	51597.3	51600.6 51614.9
配列番号343	抗-hHER2-HC-H433-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N434	配列番号1267	26	0.0	50331.8	51597.3	50334.7 50276.2
配列番号344	抗-hHER2-HC-N434-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H435	配列番号1268	25	0.6	50331.8	51597.3	51592.4 50326.8 50268.8
配列番号346	抗-hHER2-HC-L443-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S444	配列番号1269	26	0.0	50331.8	51597.3	50334.5 50275.8 50353.4
配列番号349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	配列番号1270	29	1.8	50331.8	51597.3	51595.2
配列番号31	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V110	配列番号1271	34	1.4	24811.6	26077.1	26077.8 26058.3 26096.4
配列番号32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	配列番号1272	5	1.9	24811.6	26077.1	26076.4
配列番号33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	配列番号1273	13	2.0	24811.6	26077.1	26075.6
配列番号34	抗-hHER2-LC-P119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P120	配列番号1274	1	N/A	24811.6	26077.1	N/A
配列番号37	抗-hHER2-LC-D122-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E123	配列番号1275	1	N/A	24811.6	26077.1	N/A
配列番号38	抗-hHER2-LC-Y140-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P141	配列番号1276	3	0.8	24811.6	26077.1	26077.2
配列番号39	抗-hHER2-LC-P141-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R142	配列番号1277	3	0.3	24811.6	26077.1	26076.8
配列番号40	抗-hHER2-LC-R142-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E143	配列番号1278	5	0.3	24811.6	26077.1	26077.7 24811.8 26097.2
配列番号41	抗-hHER2-LC-E143-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A144	配列番号1279	6	0.4	24811.6	26077.1	26075.6 26097.6
配列番号42	抗-hHER2-LC-D151-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N152	配列番号1280	16	0.3	24811.6	26077.1	24811.7 26077.3 24829.7

【表２１－１０】

配列番号43	抗-hHER2-LC-N152-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A153	配列番号1281	5	1.0	24811.6	26077.1	26077.2
配列番号44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	配列番号1282	13	1.9	24811.6	26077.1	26077.7 26096.6
配列番号45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	配列番号1283	21	1.2	24811.6	26077.1	26078.2 26096.9
配列番号46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	配列番号1284	14	2.0	24811.6	26077.1	26075.2
配列番号47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	配列番号1285	19	1.9	24811.6	26077.1	26077.6 26097.6
配列番号48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	配列番号1286	17	0.7	24811.6	26077.1	26077.2
配列番号50	抗-hHER2-LC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E165	配列番号1287	14	0.0	24811.6	26077.1	24810.0
配列番号51	抗-hHER2-LC-E165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q166	配列番号1288	0	N/A	24811.6	26077.1	N/A
配列番号52	抗-hHER2-LC-Q166-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-D167	配列番号1289	17	0.0	24811.6	26077.1	24810.4 24832.4
配列番号53	抗-hHER2-LC-D167-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S168	配列番号1290	24	0.7	24811.6	26077.1	26077.4 24812.3 26096.5
配列番号54	抗-hHER2-LC-T197-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H198	配列番号1291	8	1.2	24811.6	26077.1	24812.0 26077.9 24831.4
配列番号56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	配列番号1292	5	1.9	24811.6	26077.1	26076.0
配列番号59	抗-hHER2-LC-S202-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S203	配列番号1293	8	2.0	24811.6	26077.1	26077.4 26095.9
配列番号63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	配列番号1294	15	2.0	24618.4	25883.9	25883.2
配列番号64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	配列番号1295	17	1.6	24618.4	25883.9	25881.2
配列番号65	抗-hHER2-LC-P119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P120	配列番号1296	13	0.0	24618.4	25883.9	24618.1 24637.6
配列番号66	抗-hHER2-LC-P120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S121	配列番号1297	9	0.0	24618.4	25883.9	24617.2

【表２１－１１】

配列番号67	抗-hHER2-LC-S121-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D122	配列番号1298	4	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
配列番号68	抗-hHER2-LC-D122-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E123	配列番号1299	2	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
配列番号69	抗-hHER2-LC-Y140-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P141	配列番号1300	5	0.1	24618.4	25883.9	24616.4
配列番号71	抗-hHER2-LC-R142-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E143	配列番号1301	13	0.1	24618.4	25883.9	24618.8 25884.0 24639.3
配列番号72	抗-hHER2-LC-E143-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A144	配列番号1302	10	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
配列番号73	抗-hHER2-LC-D151-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N152	配列番号1303	17	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
配列番号74	抗-hHER2-LC-N152-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A153	配列番号1304	17	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
配列番号75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	配列番号1305	20	1.8	24618.4	25883.9	25882.8
配列番号76	抗-hHER2-LC-L154-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q155	配列番号1306	25	0.6	24618.4	25883.9	25884.6 24618.9 25904.2
配列番号77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	配列番号1307	27	1.1	24618.4	25883.9	25883.9 24619.0 25903.2
配列番号79	抗-hHER2-LC-S162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V163	配列番号1308	7	0.0	24618.4	25883.9	24616.4
配列番号81	抗-hHER2-LC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E165	配列番号1309	10	0.0	24618.4	25883.9	24616.4
配列番号82	抗-hHER2-LC-E165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q166	配列番号1310	29	0.0	24618.4	25883.9	24618.9 24639.4
配列番号83	抗-hHER2-LC-Q166-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D167	配列番号1311	20	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
配列番号84	抗-hHER2-LC-D167-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S168	配列番号1312	28	0.0	24618.4	25883.9	24618.8 24639.0
配列番号85	抗-hHER2-LC-T197-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H198	配列番号1313	5	0.0	24618.4	25883.9	24615.2
配列番号87	抗-hHER2-LC-Q199-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G200	配列番号1314	7	0.0	24618.4	25883.9	24617.2

【表２１－１２】

配列番号88	抗-hHER2-LC-G200-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L201	配列番号1315	18	0.2	24618.4	25883.9	24618.8 25884.4 24638.9
配列番号89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	配列番号1316	15	0.8	24618.4	25883.9	25884.0

[a] 名称は、ペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を、結合された化合物と共に表し、対の野生型鎖は列挙されていない。
[b] タンパク質A精製の後に測定された培養液1リットルあたりの抗体の収量(培養液35mLに基づく)
[c] HPLCによる薬物-対-抗体比
[d] 抗体について予想された質量(ダルトン)
[e] ADCについて予想された質量(ダルトン)
[f] Agilent 6520 Q-TOF装置(Agilent Technologies)で検出された質量(ダルトン)。多くの顕著な観察は初めに列挙されている。
[g] 観察質量は、重鎖の非切断(non-clipped)C末端リシン残基に対応する。
n.d.=未決定。薬物-対-抗体比は、ピークの重複により、HPLCによって正確に決定することができなかった。
N/A=該当なし。コンジュゲーションを試みなかったか、または低収量により、データを得ることができなかった。

【実施例２６】

【０５９８】

薬物動態（ＰＫ）研究およびさらなる特徴付けのための、選択されたペプチドタグ付きＡＤＣのスケールアップ

ＰＥＰＰシステムでは、ＰＫ研究のための十分な量のペプチドタグ付きＡＤＣが得られない。その後で、実施例２５で検査した１８３種の抗体（表２１）のうちから選択した９７種の構築物（表２２）の発現を、２００～１０００ｍＬ培養体積までスケールアップした。スケールアップについての選択基準は、実施例２５で調製したＡＤＣについて観察された高いコンジュゲーション効率、合理的な発現収量、インビトロ効力が確認されたこと、および低い凝集レベルであった。

【０５９９】

選択されたＳ６／ｙｂｂＲタグ付き抗体をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中、３７℃にて、５％CO_2下で５日間発現させた後に、培養物を遠心分離によって採集し、結果として生じた培地上清を０．２２μｍフィルター（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に通した。抗体発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって検査した。次に、濾液を０．５～１ｍＬ／分の流速で、タンパク質Ａ樹脂０．５ｍＬを含有するＰＢＳ平衡化カラムに、ＭＩＮＩＰＵＬＳ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎぜん動ポンプ（Ｇｉｌｓｏｎ Ｉｎｃ．）を使用することによって負荷した。カラムをＰＢＳ１００～２００カラム体積で洗浄した後に、抗体構築物を０．１Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ３．０）で２つの２．５ｍＬ画分に溶離した。両方の画分をすぐにトリス－ＨＣｌ緩衝液（１Ｍ、ｐＨ８．０）２５～３８％（ｖ／ｖ）で中和した。タンパク質Ａ精製抗体（表２２）の収量を決定するために、溶離液のタンパク質濃度をＮＤ－１０００ ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計（ＮａｎｏＤｒｏｐ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で２８０ｎｍで、ＩｇＧ分子について事前設定されたモル吸光係数を使用して二重に測定した。Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｃａｓｓｅｔｔｅｓ（３．５～７．０ｋＤａカットオフ、Ｐｉｅｒｃｅ）を使用して、各構築物の第２溶離画分を、その後のＤＳＦによる非コンジュゲート抗体の熱安定性測定のためにＰＢＳに透析した（表２３）。各ペプチドタグ付き抗体の第１溶離画分をコンジュゲーション緩衝液（２０ｍＭ ＮａＣｌおよび１２．５ｍＭ $MgCl_2$を補充されている７５ｍＭトリス－ＨＣｌ緩衝液、ｐＨ８．０）に透析した。抗体濃度を２．５μＭに調整した後に、コンジュゲーション反応を、ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦおよびＳｆｐ酵素をそれぞれ３０～６０μＭおよび１～４μＭの最終濃度まで加えることによって開始した

。酵素反応を室温にて約１６～２０時間進行させ、その後、標識度を分析用逆相ＨＰＬＣによって、個々の脱共役抗体を対照として使用して検査した（表２２）。すべてのコンジュゲーション反応を質量分析法によって、Ａｇｉｌｅｎｔ　６５２０　Ｑ－ＴＯＦ装置で分析した（表２２）。ほぼ定量的なコンジュゲーションを確認した後に、反応混合物を、３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心濾過デバイス（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して１ｍＬの最終体積まで濃縮した。遠心分離によって沈澱物を除去した後に、Ｓｆｐ酵素および過剰のＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ基質をＳＥＣ（サイズ排除クロマトグラフィー）によって、ＨｉＬｏａｄ　２６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００分取グレードカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で、ＰＢＳ中、１ｍＬ／分の流速で除去した。ＳＥＣの後のペプチドタグ付きＡＤＣの純度を、逆相ＨＰＬＣによって評価した。０．２２μｍ濾過の後に、ＡＤＣの最終収量を上記のとおり、ＮＤ－１０００　ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計（ＮａｎｏＤｒｏｐ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）での三重の測定を使用して決定した（表２２）。

【０６００】

【表２２－１】

表22. 200～1000mLスケールアップ培養からのADC生成および特徴付け

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	配列番号1137	57	31	2.0	97	51790.5	51786.4
配列番号152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	配列番号1138	40	23	2.0	100	51790.5	51796.4
配列番号157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	配列番号1139	41	20	2.0	100	51790.5	51785.2
配列番号158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	配列番号1140	40	20	2.0	100	51790.5	51785.6

【表２２－２】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	配列番号1147	25	16	2.0	100	51790.5	51791.6
配列番号168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	配列番号1148	32	15	2.0	100	51790.5	51787.6
配列番号169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	配列番号1149	39	21	2.0	100	51790.5	51786.4
配列番号173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	配列番号1152	36	25	2.0	100	51790.5	51792.0
配列番号178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	配列番号1156	35	21	2.0	100	51790.5	51794.8
配列番号179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	配列番号1157	39	21	1.9	100	51790.5	51790.4
配列番号202	抗-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	配列番号1172	9	4	1.9	100	51790.5	51782.0
配列番号218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	配列番号1181	30	14	1.8	100	51790.5	51796.4 50526.8[h]
配列番号220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	配列番号1182	20	9	2.0	100	51790.5	51794.4 51918.4[i]
配列番号221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	配列番号1183	47	26	1.9	100	51790.5	51794.8
配列番号224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	配列番号1186	37	21	2.0	100	51790.5	51795.6
配列番号229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	配列番号1187	46	21	1.9	100	51790.5	51785.2
配列番号127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	配列番号1118	40	25	2.0	100	51790.5	51792.4
配列番号239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	配列番号1195	55	26	2.0	100	51790.5	51786.8 51914.4[i]
配列番号244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	配列番号1197	41	10	1.9	n.d.	51790.5	51785.2 51912.8[i]
配列番号248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	配列番号1199	9	3	1.9	100	51790.5	51783.2 51910.8[i]

【表２２－３】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	配列番号1201	35	25	1.9	100	51597.3	51591.2
配列番号251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	配列番号1202	42	24	1.9	100	51597.3	51592.4
配列番号257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	配列番号1203	33	20	1.9	100	51597.3	51602.0
配列番号259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	配列番号1204	26	14	1.9	100	51597.3	51592.0
配列番号268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	配列番号1209	33	21	1.9	100	51597.3	51595.2
配列番号277	抗-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	配列番号1215	24	14	1.9	100	51597.3	51592.4
配列番号315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	配列番号1243	35	22	1.9	100	51597.3	51600.4
配列番号317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	配列番号1245	20	12	1.8	100	51597.3	51589.2 50323.6[h]
配列番号129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	配列番号1122	51	28	1.9	100	51597.3	51592.0
配列番号349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	配列番号1270	37	23	1.9	100	51597.3	51590.4
配列番号32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	配列番号1272	8	3	2.0	93	26077.1	26074.8
配列番号33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	配列番号1273	20	13	2.0	100	26077.1	26073.6
配列番号46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	配列番号1284	29	19	1.9	100	26077.1	26070.8
配列番号48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	配列番号1251	9	5	1.9	100	26077.1	26076.0
配列番号56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	配列番号1292	10	3	1.9	100	26077.1	26074.4
配列番号63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	配列番号1294	53	30	1.9	100	25883.9	25880.8

【表２２－４】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	配列番号1295	12	8	1.9	100	25883.9	25880.4 25901.2[j]
配列番号75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	配列番号1305	14	7	1.9	100	25883.9	25878.0
配列番号89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	配列番号1316	26	15	1.8	100	25883.9	25881.2
配列番号330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	配列番号1256	23	14	1.9	100	51597.3	51592.7
配列番号195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	配列番号1167	20	7	2.0	100	51790.5	51786.1 51727.9[k]
配列番号206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	配列番号1173	28	16	1.9	100	51790.5	51786.8
配列番号288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	配列番号1221	28	18	2.0	100	51597.3	51593.9 50407.9[l]
配列番号249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	配列番号1200	24	15	1.9	100	51597.3	51595.9
配列番号323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	配列番号1251	23	13	1.9	100	51597.3	51594.6
配列番号322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	配列番号1250	24	15	1.9	100	51597.3	51594.6
配列番号301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	配列番号1233	21	13	1.9	100	51597.3	51594.1
配列番号279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	配列番号1217	12	7	1.9	100	51597.3	51595.9
配列番号293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	配列番号1226	19	11	2.0	100	51597.3	51595.3
配列番号194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	配列番号1166	23	3	2.0	n.d.	51790.5	51788.3 51597.3[j] 51729.3[k]
配列番号337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	配列番号1261	22	10	2.0	100	51597.3	51595.0 51537.0[k]
配列番号201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	配列番号1171	17	9	2.0	100	51790.5	51788.7

【表２２－５】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	配列番号1207	20	14	1.9	100	51597.3	51596.6
配列番号274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	配列番号1213	22	12	2.0	100	51597.3	51596.9
配列番号275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	配列番号1214	22	14	2.0	100	51597.3	51597.0
配列番号177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	配列番号1155	18	10	2.0	100	51790.5	51790.8
配列番号294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	配列番号1227	12	7	2.0	100	51597.3	51595.0 51536.9[k]
配列番号199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	配列番号1169	13	6	2.0	100	51790.5	51789.1
配列番号198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	配列番号1168	9	5	2.0	100	51790.5	51788.7
配列番号189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	配列番号1163	9	4	2.0	100	51790.5	51789.6
配列番号223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	配列番号1185	15	6	2.0	100	51790.5	51789.2
配列番号193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	配列番号1165	7	3	1.9	100	51790.5	51788.9 51729.9[k]
配列番号182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	配列番号1160	30	15	1.9	100	51790.5	51790.1
配列番号296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	配列番号1228	10	5	2.0	100	51597.3	51595.2
配列番号278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	配列番号1216	12	6	2.0	100	51597.3	51597.3
配列番号299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	配列番号1231	9	5	1.9	100	51597.3	51595.7
配列番号150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	配列番号1136	10	4	2.0	100	51790.5	51792.2
配列番号185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	配列番号1161	27	12	2.0	100	51790.5	51789.6

【表２２－６】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	配列番号1285	23	15	2.0	100	26077.1	26076.5 25457.3[i]
配列番号91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	配列番号1317	15	8	1.9	100	25883.9	25883.5 28925.4[i]
配列番号60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	配列番号1318	15	6	2.0	100	26077.1	26076.7
配列番号61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	配列番号1319	9	4	1.9	100	26077.1	26076.7
配列番号90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	配列番号1320	22	13	1.9	100	25883.9	25883.6
配列番号44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	配列番号1282	30	22	2.0	100	26077.1	26075.7 25456.0[i]
配列番号267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	配列番号1208	25	19	2.0	100	51597.3	51597.0
配列番号176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	配列番号1154	15	8	2.0	100	51790.5	51791.2
配列番号300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	配列番号1232	33	26	1.9	100	51597.3	51595.2
配列番号180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	配列番号1158	27	17	2.0	100	51790.5	51787.2
配列番号175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	配列番号1153	43	23	2.0	100	51790.5	51791.5
配列番号341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	配列番号1265	42	33	2.0	100	51597.3	51595.0
配列番号289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	配列番号1222	49	38	1.9	100	51597.3	51595.2 50408.8[i]
配列番号342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	配列番号1266	39	31	2.0	100	51597.3	51596.7 51725.6[i]
配列番号77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	配列番号1307	45	35	1.9	100	25883.9	25883.0 28925.2[i]
配列番号45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	配列番号1283	35	27	2.0	100	26077.1	26076.8 28925.2[i]

【表２２－７】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体収量[b] (mg/L)	ADC収量[c] (mg/L)	DAR[d]	モノマー[e] (%)	期待質量[f] (Da)	観察質量[g] (Da)
配列番号237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	配列番号1193	8	4	2.0	81	51790.5	51790.9 51917.9[i]
配列番号187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	配列番号1162	4	1	2.0	100	51790.5	51790.0
配列番号160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	配列番号1141	17	12	2.0	100	51790.5	51790.1
配列番号370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	配列番号1321	18	9	1.9	100	51800.5	51798.3 50533.6[h]
配列番号372	抗-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	配列番号1322	22	10	1.5	100	51800.5	51799.0 50533.8[h]
配列番号374	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	配列番号1323	23	10	1.9	100	51800.5	51799.2
配列番号376	抗-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	配列番号1324	8	4	1.8	100	51800.5	51799.3 50534.1[h]
配列番号377	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	配列番号1325	14	7	1.9	100	51800.5	51799.2
配列番号378	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	配列番号1326	11	5	1.9	100	51800.5	51799.2
配列番号380	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	配列番号1327	16	9	1.9	100	51800.5	51799.0
配列番号381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	配列番号1328	25	10	1.9	100	51800.5	51799.2
配列番号383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	配列番号1329	27	10	1.9	100	26087.1	26085.8 28924.5[i]
配列番号384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	配列番号1330	27	10	1.9	100	26087.1	26086.0 28924.7[i]

【表２２－８】

[a] 名称は、ペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を、結合された化合物と共に表し、対の野生型鎖は列挙されていない。
[b] タンパク質A精製の後に測定された培養液1リットルあたりの抗体の収量(培養液200～1000 mLに基づく)
[c] サイズ排除クロマトグラフィーの後に測定された培養液1リットルあたりのADC収量
[d] HPLCによる薬物-対-抗体比
[e] ADCについての分析用サイズ排除クロマトグラフィー結果(モノマーのパーセント)
[f] ADCについて予想された質量(ダルトン)
[g] Agilent 6520 Q-TOF装置(Agilent Technologies)で検出された質量(ダルトン)。多くの顕著な観察は初めに列挙されている。
[h] 観察質量は非コンジュゲート抗体に対応する。
[i] 観察質量は、重鎖の非切断C末端リシン残基に対応する。
[j] 観察質量はおそらく、ナトリウム付加物に対応する。
[k] 観察質量は、重鎖の切断Gly446残基に対応する。
[l] 観察質量は、未知の低量の種に対応する。
[j] キャリーオーバーピーク
n.d.=未決定。

【０６０１】

選択されたペプチドタグ付き抗体の発現レベルは、細胞培養液１リットルあたり２５ｍｇと平均され（４～５７ｍｇ／Ｌの範囲）（表２２）、精製ＡＤＣの最終収量は、細胞培養液１リットルあたり１４ｍｇと平均された（１～３８ｍｇ／Ｌの範囲）（表２２）。ＨＰＬＣおよびＭＳによって検査すると、すべてのＡＤＣが、２個のＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ分子と、１．９の平均ＤＡＲ（ＤＡＲは１．５～２．０の範囲）で部位特異的にコンジュゲートした（表２２）。調製された９７種のＡＤＣのうちの９２種で、凝集またはオリゴマー種は検出されなかった（表２２）。分析用サイズ排除クロマトグラフィーによって決定すると、すべての他のＡＤＣは、少なくとも８１％モノマーであった（２種のＡＤＣについてはデータがない）。非コンジュゲート抗体およびＡＤＣの熱安定性をＤＳＦによって特徴付けた（表２３）。野生型トラスツズマブでは、２つのＤＳＦ熱溶融遷移（Ｔｍ１およびＴｍ２）が６９．７℃および８１．２℃で観察された。９７種のペプチドタグ付き抗体のうちの２８種では、両方の遷移が、野生型トラスツズマブで観察された遷移から３℃未満の範囲内である。ＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦのコンジュゲーションは、非コンジュゲート抗体に対して、ＡＤＣのＴｍ１を平均して１．２℃低下させ、ＡＤＣのＴｍ２を平均して０．６℃低下させた（表２３）。３７種の抗体（およびＡＤＣ）では、熱安定性が、Ｔｍ１における差異によって示されるとおり、野生型トラスツズマブに対してかなり（＞３℃）低下した。この遷移は、ＩｇＧのＣＨ２ドメイン（アミノ酸残基２２８～３４０）のアンフォールディングに帰せられ、実際に、不安定化した抗体のうちの多くが、ＣＨ２ドメイン中の位置に挿入されたペプチドタグを有する。具体的に、図１８のプロットは、ＣＨ２ドメインへのペプチドタグ挿入は一般に、重鎖の隣接するＣＨ１およびＣＨ３ドメインへの個々のペプチドタグ挿入のＴｍ１値よりも低いＴｍ１値につながることを示している。上述のとおり、ペプチドタグの位置は、結果として生じる抗体およびＡＤＣの特性に有意に影響を及ぼし得る。

【０６０２】

【表２３－１】

表23. 示差走査蛍光分析(DSF)によって決定された修飾抗体およびADCの熱安定性

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
配列番号151	抗 -hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	配列番号1137	69.8	t.b.	69.2	t.b.	-0.6	t.b.	0.1
配列番号152	抗 -hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	配列番号1138	69.1	t.b.	68.8	t.b.	-0.3	t.b.	-0.6
配列番号157	抗 -hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	配列番号1139	67.6	81.3	67.1	81.2	-0.5	-0.1	-2.1
配列番号158	抗 -hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	配列番号1140	67.9	81.3	67.3	81.3	-0.6	0	-1.8
配列番号166	抗 -hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	配列番号1147	69.3	80.0	68.9	79.8	-0.3	-0.2	-0.4
配列番号168	抗 -hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	配列番号1148	68.9	80.4	68.8	80.5	-0.2	0.1	-0.8
配列番号169	抗 -hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	配列番号1149	69.2	80.4	68.8	80.2	-0.4	-0.2	-0.5
配列番号173	抗 -hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	配列番号1152	69.0	80.5	68.3	80.4	-0.7	-0.2	-0.7
配列番号178	抗 -hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	配列番号1156	68.7	80.8	67.6	80.9	-1.1	0.1	-1.0
配列番号179	抗 -hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	配列番号1157	69.3	81.1	68.8	80.9	-0.5	-0.1	-0.4
配列番号202	抗 -hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	配列番号1172	53.4	81.6	51.2	81.2	-2.2	-0.4	-16.3
配列番号218	抗 -hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	配列番号1181	52.5	81.5	49.0	81.1	-3.5	-0.3	-17.2
配列番号220	抗 -hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	配列番号1182	65.2	77.3	58.7	81.0	-6.5	3.7	-4.5
配列番号221	抗 -hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	配列番号1183	65.0	76.9	56.0	81.0	-9	4.2	-4.7
配列番号224	抗 -hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	配列番号1186	58.6	81.4	57.7	81.2	-0.9	-0.2	-11.1
配列番号229	抗 -hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	配列番号1187	70.1	81.7	68.8	81.4	-1.3	-0.3	0.4

【表２３－２】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
配列番号127	抗 -hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	配列番号1118	66.4	81.3	66.2	80.9	-0.2	-0.4	-3.3
配列番号239	抗 -hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	配列番号1195	69.0	81.0	68.3	81.1	-0.7	0.1	-0.7
配列番号244	抗 -hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	配列番号1197	60.5	81.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-9.2
配列番号248	抗 -hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	配列番号1199	71.8	81.0	69.9	80.5	-1.8	-0.5	2.1
配列番号250	抗 -hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	配列番号1201	70.1	t.b.	71.2	t.b.	1	t.b.	0.4
配列番号251	抗 -hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	配列番号1202	70.4	t.b.	70.4	t.b.	0	t.b.	0.7
配列番号257	抗 -hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	配列番号1203	69.3	80.8	68.3	81.0	-1.1	0.2	-0.4
配列番号259	抗 -hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	配列番号1204	69.3	80.9	68.5	81.2	-0.7	0.2	-0.4
配列番号268	抗 -hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	配列番号1209	69.6	80.3	69.2	80.5	-0.4	0.1	-0.1
配列番号277	抗 -hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	配列番号1215	69.3	81.1	68.5	80.9	-0.9	-0.1	-0.4
配列番号315	抗 -hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	配列番号1243	56.9	78.8	50.4	81.0	-6.5	2.1	-12.8
配列番号317	抗 -hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	配列番号1245	54.2	81.1	51.3	81.2	-2.9	0.1	-15.5
配列番号129	抗 -hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	配列番号1122	69.3	81.5	68.8	81.0	-0.6	-0.5	-0.4
配列番号349	抗 -hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	配列番号1270	69.9	81.2	69.9	80.9	0	-0.4	0.2
配列番号32	抗 -hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	配列番号1272	66.9	t.b.	66.3	t.b.	-0.6	t.b.	-2.8
配列番号33	抗 -hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-	配列番号	67.3	t.b.	66.0	t.b.	-1.3	t.b.	-2.4

【表２３－３】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LSWLLRLLN-A112	1273							
配列番号46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	配列番号1284	69.4	80.0	68.7	79.4	-0.7	-0.6	-0.3
配列番号48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	配列番号1251	68.5	t.b.	67.3	t.b.	-1.2	t.b.	-1.2
配列番号56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	配列番号1292	67.5	t.b.	67.4	t.b.	-0.1	t.b.	-2.2
配列番号63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	配列番号1294	69.0	t.b.	67.6	t.b.	-1.4	t.b.	-0.7
配列番号64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	配列番号1295	69.6	t.b.	68.5	t.b.	-1.1	t.b.	-0.1
配列番号75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	配列番号1305	69.6	79.7	69.0	79.2	-0.5	-0.5	-0.1
配列番号89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	配列番号1316	69.5	75.1	68.7	74.8	-0.8	-0.4	-0.2
配列番号330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	配列番号1256	67.8	79.1	67.3	78.7	-0.5	-0.5	-1.9
配列番号195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	配列番号1167	52.0	76.9	49.7	78.6	-2.3	1.7	-17.7
配列番号206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	配列番号1173	56.0	77.3	65.4	77.9	9.4	0.6	-13.7
配列番号288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	配列番号1221	64.1	79.4	63.5	78.9	-0.6	-0.5	-5.6
配列番号249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	配列番号1200	68.1	t.b.	67.8	t.b.	-0.3	t.b.	-1.6
配列番号323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	配列番号1251	60.5	79.2	58.4	78.6	-2.1	-0.5	-9.2
配列番号322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	配列番号1250	59.5	79.2	57.6	78.7	-1.8	-0.5	-10.2
配列番号301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	配列番号1233	53.0	79.8	49.8	78.0	-3.1	-1.8	-16.7
配列番号279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-	配列番号	68.2	77.3	68.2	77.3	0.0	0.0	-1.5

【表２３－４】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-T197	1217							
配列番号293	抗 -hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	配列番号1226	57.9	79.2	53.3	78.5	-4.5	-0.7	-11.8
配列番号194	抗 -hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	配列番号1166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号337	抗 -hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	配列番号1261	67.5	78.8	66.8	78.5	-0.8	-0.3	-2.2
配列番号201	抗 -hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	配列番号1171	67.7	75.9	43.9	77.7	-23.8	1.8	-2.0
配列番号265	抗 -hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	配列番号1207	69.0	78.2	68.1	76.4	-0.9	-1.7	-0.7
配列番号274	抗 -hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	配列番号1213	68.3	77.8	66.8	74.9	-1.5	-2.9	-1.4
配列番号275	抗 -hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	配列番号1214	68.4	78.1	66.9	76.1	-1.4	-1.9	-1.3
配列番号177	抗 -hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	配列番号1155	68.0	77.1	66.7	75.9	-1.3	-1.2	-1.7
配列番号294	抗 -hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	配列番号1227	58.4	79.3	54.4	78.7	-4.1	-0.5	-11.3
配列番号199	抗 -hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	配列番号1169	49.8	78.9	48.1	77.6	-1.6	-1.3	-19.9
配列番号198	抗 -hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	配列番号1168	49.1	78.9	47.4	78.0	-1.7	-0.9	-20.6
配列番号189	抗 -hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	配列番号1163	61.1	79.3	62.3	79.1	1.2	-0.2	-8.6
配列番号223	抗 -hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	配列番号1185	56.9	79.0	55.3	78.4	-1.5	-0.6	-12.9
配列番号193	抗 -hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	配列番号1165	50.3	79.0	46.2	78.7	-4.1	-0.3	-19.4
配列番号182	抗 -hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	配列番号1160	58.8	63.4	56.1	61.9	-2.7	-1.6	-10.9
配列番号296	抗 -hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-	配列番号	59.9	75.9	66.8	74.8	6.9	-1.2	-9.8

【表２３－５】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-E258	1228							
配列番号278	抗 -hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	配列番号1216	68.4	77.7	66.8	75.5	-1.6	-2.2	-1.3
配列番号299	抗 -hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	配列番号1231	53.9	79.4	69.4	t.b.	15.5	t.b.	-15.8
配列番号150	抗 -hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	配列番号1136	70.0	t.b.	64.6	79.0	-5.3	t.b.	0.3
配列番号185	抗 -hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	配列番号1161	60.4	79.2	69.0	75.1	8.6	-4.1	-9.3
配列番号47	抗 -hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	配列番号1285	70.1	75.8	67.4	t.b.	-2.7	t.b.	0.4
配列番号91	抗 -hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	配列番号1317	68.9	74.0	66.4	t.b.	-2.5	t.b.	-0.8
配列番号60	抗 -hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	配列番号1318	66.6	t.b.	65.4	t.b.	-1.3	t.b.	-3.1
配列番号61	抗 -hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	配列番号1319	65.4	t.b.	62.8	t.b.	-2.6	t.b.	-4.3
配列番号90	抗 -hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	配列番号1320	68.6	t.b.	66.9	t.b.	-1.8	t.b.	-1.1
配列番号44	抗 -hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	配列番号1282		77.8	66.7	76.1		-1.6	
配列番号267	抗 -hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	配列番号1208	69.0	78.3	68.1	77.4	-0.9	-1.0	-0.7
配列番号176	抗 -hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	配列番号1154	66.4	77.9	65.5	74.6	-0.9	-3.3	-3.3
配列番号300	抗 -hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	配列番号1232	53.7	79.6	51.3	77.9	-2.4	-1.7	-16.0
配列番号180	抗 -hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	配列番号1158	66.5	75.9	65.5	73.9	-0.9	-2.0	-3.3
配列番号175	抗 -hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	配列番号1153	66.3	77.2	65.7	77.1	-0.6	-0.1	-3.4
配列番号341	抗 -hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-	配列番号	67.9	78.9	67.3	78.4	-0.6	-0.6	-1.8

【表２３－６】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-N421	1265							
配列番号289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	配列番号1222	66.2	79.3	63.1	78.8	-3.1	-0.5	-3.5
配列番号342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	配列番号1266	68.9	t.b.	68.1	77.4	-0.7	t.b.	-0.9
配列番号77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	配列番号1307	69.3	77.1	68.3	76.0	-1.0	-1.2	-0.4
配列番号45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	配列番号1283	68.9	77.2	67.6	75.9	-1.2	-1.3	-0.9
配列番号237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	配列番号1193	63.4	78.9	66.7	78.4	3.3	-0.6	-6.3
配列番号187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	配列番号1162	44.9	78.5	44.0	77.7	-0.9	-0.8	-24.8
配列番号160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	配列番号1141	67.1	78.8	66.6	78.1	-0.5	-0.7	-2.6
配列番号370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	配列番号1321	68.9	78.2	67.7	75.9	-1.1	-2.3	-0.8
配列番号372	抗-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	配列番号1322	69.0	78.4	68.3	77.5	-0.8	-0.9	-0.7
配列番号374	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	配列番号1323	69.1	78.7	68.1	77.5	-1.0	-1.3	-0.6
配列番号376	抗-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	配列番号1324	68.0	78.0	66.6	76.6	-1.4	-1.5	-1.7
配列番号377	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	配列番号1325	68.0	78.1	66.5	76.2	-1.5	-2.0	-1.7
配列番号378	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	配列番号1326	68.1	78.4	66.7	76.4	-1.4	-1.9	-1.6
配列番号380	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	配列番号1327	68.3	78.4	66.9	76.7	-1.4	-1.7	-1.4
配列番号381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	配列番号1328	68.3	77.9	66.9	75.8	-1.4	-2.1	-1.4
配列番号383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-	配列番号	66.5	t.b.	64.3	t.b.	-2.2	t.b.	-3.2

【表２３－７】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	抗体Tm1 (°C)	抗体Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LDMLEWSLM-V110	1329							
配列番号384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	配列番号1330	66.1	t.b.	63.8	t.b.	-2.3	t.b.	-3.6

[a] 名称は、ペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を、結合された化合物と共に表し、対の野生型鎖は列挙されていない。

[b] ADCのTM-抗体のTm

[c] 抗体のTm1-野生型トラスツズマブのTm1(69.7°C)。

n.d.=未決定。試料の量が不十分だったため、測定を行わなかった。

t.b.=Tm2を正確に決定するには、遷移が広すぎた。

【０６０３】

精製ＡＤＣを、２種の操作された細胞系、ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６およびクローン４０、ならびに標的化抗原ヒトＨＥＲ２を細胞表面上に内因性発現する２種の細胞系（ＪｉｍＴ１およびＨＣＣ１９５４）を含めた選択された細胞系（表２４）に対するインビトロ効力について特徴付けた。ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６細胞は、細胞１個あたり約５００，０００コピーのＨＥＲ２を安定発現する一方で、クローン４０は、約５０００コピー／細胞しか発現しない。ＨＣＣ１９５４細胞は、高レベル（約５００，０００コピー／細胞）のヒトＨＥＲ２を表面上に内因性発現する（Clinchy B、Gazdar A、Rabinovsky R、Yefenof E、Gordon B、Vitetta ES. Breast Cancer Res Treat. (2000) 61:217～228）。ＪｉｍＴ１細胞系は、細胞１個あたり約８０，０００コピーのＨＥＲ２を発現する（Mocanu M-M、Fazekas Z、Petras M、Nagy P、Sebestyen Z、Isola J、Timar J、Park JW、Vereb G、Szollosi J.Cancer Letters (2005)227:201～212）。自動システム（Melnickら、(2006)Proc Natl Acad Sci U S A. 103:3153～3158）を用いて、細胞を様々な濃度のＡＤＣと共にインキュベートしてから５日後に、細胞増殖アッセイをＣｅｌｌ－Ｔｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）で行った（Rissら、(2004) Assay Drug Dev Technol. 2:51～62）。トラスツズマブペプチドタグ付き－ＭＭＡＦ　ＡＤＣは特異的に、ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６、ＨＣＣ１９５４、およびＪｉｍＴ１細胞を殺滅し（表２４）：トラスツズマブペプチドタグ付き－ＭＭＡＦ　ＡＤＣのＩＣ$_{50}$値は、ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６、ＨＣＣ１９５４、およびＪｉｍＴ１細胞についてそれぞれ約０．４５ｎＭ、０．２４ｎＭ、および２．０ｎＭと平均され（表２４）、異なるＨＥＲ２発現レベルと一致した。抗原陰性（低Ｈｅｒ２）対照細胞系ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン４０の殺滅は、最高試験濃度（３３ｎＭ）でも、９７種のＡＤＣのうちの９２種で観察されなかった。

【０６０４】

【表２４－１】
表24. 抗HER2 ADCのインビトロ効力。HER2陽性および陰性細胞系についてのIC$_{50}$細胞殺滅濃度を報告する。

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC$_{50}$ (μM)[b]	JimT1 IC$_{50}$ (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC$_{50}$ (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC$_{50}$ (μM)[b]
配列番号151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	配列番号1137	1.94E-04	5.10E-04	6.82E-04	> 3.33E-02
配列番号152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	配列番号1138	1.69E-04	7.53E-04	7.02E-04	> 3.33E-02
配列番号157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	配列番号1139	1.36E-04	2.57E-04	3.10E-04	> 3.33E-02
配列番号158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	配列番号1140	1.64E-04	2.43E-04	3.05E-04	> 3.33E-02
配列番号166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	配列番号1147	1.55E-04	8.66E-04	3.31E-04	> 3.33E-02
配列番号168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	配列番号1148	1.89E-04	5.36E-04	4.69E-04	> 3.33E-02
配列番号169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	配列番号1149	1.69E-04	6.19E-04	4.00E-04	> 3.33E-02
配列番号173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	配列番号1152	1.47E-04	2.69E-04	2.86E-04	> 3.33E-02
配列番号178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	配列番号1156	1.03E-04	1.33E-03	3.56E-04	> 3.33E-02
配列番号179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	配列番号1157	1.42E-04	3.00E-04	2.79E-04	> 3.33E-02
配列番号202	抗-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	配列番号1172	1.33E-04	4.50E-04	6.75E-04	> 3.33E-02
配列番号218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	配列番号1181	9.68E-05	3.18E-04	4.66E-04	> 3.33E-02

【表２４－２】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
配列番号220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	配列番号1182	3.76E-04	5.55E-04	3.08E-04	> 3.33E-02
配列番号221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	配列番号1183	7.21E-05	3.58E-04	7.82E-04	> 3.33E-02
配列番号224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	配列番号1186	2.13E-03	4.47E-04	3.21E-04	> 3.33E-02
配列番号229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	配列番号1187	1.80E-04	1.31E-03	7.57E-04	> 3.33E-02
配列番号127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	配列番号1118	1.57E-04	4.21E-04	5.42E-04	> 3.33E-02
配列番号239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	配列番号1195	2.48E-04	1.24E-03	7.31E-04	> 3.33E-02
配列番号244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	配列番号1197	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	配列番号1199	7.42E-05	3.84E-03	7.44E-04	> 3.33E-02
配列番号250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	配列番号1201	1.80E-04	3.46E-04	3.21E-04	> 3.33E-02
配列番号251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	配列番号1202	1.98E-04	4.59E-04	3.94E-04	> 3.33E-02
配列番号257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	配列番号1203	6.48E-05	3.95E-04	2.62E-04	> 3.33E-02
配列番号259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	配列番号1204	1.58E-04	> 3.33E-02	3.21E-04	> 3.33E-02
配列番号268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	配列番号1209	1.65E-04	4.07E-04	3.79E-04	> 3.33E-02
配列番号	抗-hHER2-HC-G194-	配列番号	1.22E-04	6.48E-04	1.83E-04	> 3.33E-02

【表２４－３】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
277	DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	1215				
配列番号315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	配列番号1243	1.37E-04	2.79E-04	1.15E-03	> 3.33E-02
配列番号317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	配列番号1245	4.09E-04	2.24E-02	2.85E-04	> 3.33E-02
配列番号129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	配列番号1122	2.26E-04	1.83E-03	3.12E-04	> 3.33E-02
配列番号349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	配列番号1270	2.12E-04	6.82E-04	7.77E-04	> 3.33E-02
配列番号32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	配列番号1272	2.31E-04	4.14E-04	5.18E-04	> 3.33E-02
配列番号33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	配列番号1273	1.95E-04	1.15E-02	5.05E-04	> 3.33E-02
配列番号46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	配列番号1284	1.43E-04	5.47E-04	3.70E-04	> 3.33E-02
配列番号48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	配列番号1251	2.67E-04	8.13E-04	7.14E-04	> 3.33E-02
配列番号56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	配列番号1292	1.92E-04	9.21E-04	4.77E-04	> 3.33E-02
配列番号63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	配列番号1294	3.97E-04	4.62E-04	2.77E-04	> 3.33E-02
配列番号64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	配列番号1295	1.59E-04	6.32E-04	1.68E-02	> 3.33E-02
配列番号75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	配列番号1305	1.80E-04	2.03E-02	2.60E-04	> 3.33E-02
配列番号89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	配列番号1316	4.25E-04	3.86E-04	4.74E-04	> 3.33E-02
配列番号330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-	配列番号1256	2.32E-04	4.93E-04	2.26E-04	> 3.33E-02

【表２４－４】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
	LEFIASKLA-N390					
配列番号195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	配列番号1167	2.06E-04	3.67E-04	1.16E-04	> 3.33E-02
配列番号206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	配列番号1173	1.99E-04	3.04E-04	9.74E-05	> 3.33E-02
配列番号288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	配列番号1221	1.90E-04	2.97E-04	6.48E-05	> 3.33E-02
配列番号249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	配列番号1200	2.41E-04	3.39E-04	1.97E-04	> 3.33E-02
配列番号323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	配列番号1251	2.31E-04	3.39E-04	6.45E-05	> 3.33E-02
配列番号322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	配列番号1250	2.40E-04	3.75E-04	7.55E-05	> 3.33E-02
配列番号301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	配列番号1233	2.21E-04	3.78E-04	7.46E-05	> 3.33E-02
配列番号279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	配列番号1217	2.44E-04	4.28E-04	1.13E-04	> 3.33E-02
配列番号293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	配列番号1226	1.92E-04	5.49E-04	6.43E-05	> 3.33E-02
配列番号194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	配列番号1166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	配列番号1261	2.69E-04	7.57E-04	8.06E-05	> 3.33E-02
配列番号201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	配列番号1171	2.28E-04	3.41E-04	8.89E-05	> 3.33E-02
配列番号265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	配列番号1207	2.27E-04	3.42E-04	1.24E-04	> 3.33E-02
配列番号274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	配列番号1213	2.39E-04	3.21E-04	1.49E-04	> 3.33E-02

【表２４－５】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
配列番号275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	配列番号1214	2.30E-04	3.37E-04	1.47E-04	> 3.33E-02
配列番号177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	配列番号1155	2.10E-04	3.03E-04	7.99E-05	> 3.33E-02
配列番号294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	配列番号1227	2.06E-04	4.33E-04	4.40E-05	> 3.33E-02
配列番号199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	配列番号1169	2.26E-04	3.79E-04	8.97E-05	> 3.33E-02
配列番号198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	配列番号1168	2.30E-04	3.68E-04	8.13E-05	> 3.33E-02
配列番号189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	配列番号1163	2.43E-04	3.09E-04	1.44E-04	> 3.33E-02
配列番号223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	配列番号1185	2.27E-04	3.88E-04	6.27E-05	> 3.33E-02
配列番号193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	配列番号1165	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	配列番号1160	2.68E-04	9.11E-04	1.79E-04	> 3.33E-02
配列番号296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	配列番号1228	2.20E-04	5.53E-04	7.67E-05	> 3.33E-02
配列番号278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	配列番号1216	1.91E-04	3.14E-04	1.31E-04	2.90E-02
配列番号299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	配列番号1231	2.33E-04	3.97E-04	1.13E-04	> 3.33E-02
配列番号150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	配列番号1136	2.57E-04	6.74E-04	1.95E-04	> 3.33E-02
配列番号	抗-hHER2-HC-A231-	配列番号	2.32E-04	2.70E-04	1.72E-04	> 3.33E-02

【表２４－６】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
185	GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	1161				
配列番号47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	配列番号1285	1.63E-04	2.74E-04	1.39E-04	> 3.33E-02
配列番号91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	配列番号1317	2.20E-04	3.33E-04	1.84E-04	> 3.33E-02
配列番号60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	配列番号1318	2.32E-04	4.29E-04	1.28E-04	> 3.33E-02
配列番号61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	配列番号1319	2.23E-04	4.54E-04	1.78E-04	1.49E-02
配列番号90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	配列番号1320	2.41E-04	4.33E-04	1.82E-04	> 3.33E-02
配列番号44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	配列番号1282	2.44E-04	3.95E-04	1.42E-04	> 3.33E-02
配列番号267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	配列番号1208	1.64E-04	3.00E-04	1.22E-04	> 3.33E-02
配列番号176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	配列番号1154	2.53E-04	3.41E-04	1.81E-04	3.25E-02
配列番号300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	配列番号1232	2.47E-04	4.49E-04	1.87E-04	> 3.33E-02
配列番号180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	配列番号1158	2.49E-04	2.69E-04	1.81E-04	2.26E-02
配列番号175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	配列番号1153	2.35E-04	3.10E-04	1.81E-04	> 3.33E-02
配列番号341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	配列番号1265	2.47E-04	7.03E-04	1.56E-04	> 3.33E-02
配列番号289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-	配列番号1222	2.37E-04	1.75E-03	1.30E-04	> 3.33E-02

【表２４－７】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
	LEFIASKLA-G237					
配列番号342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	配列番号1266	2.47E-04	2.27E-02	1.59E-04	> 3.33E-02
配列番号77	抗 -hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	配列番号1307	2.21E-04	4.48E-04	1.70E-04	> 3.33E-02
配列番号45	抗 -hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	配列番号1283	2.48E-04	4.57E-04	1.26E-04	> 3.33E-02
配列番号237	抗 -hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	配列番号1193	6.68E-04	8.65E-04	2.69E-04	3.03E-02
配列番号187	抗 -hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	配列番号1162	2.43E-04	4.47E-04	1.01E-04	> 3.33E-02
配列番号160	抗 -hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	配列番号1141	2.44E-04	3.16E-04	1.78E-04	> 3.33E-02
配列番号370	抗 -hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	配列番号1321	2.28E-04	3.48E-04	1.63E-04	> 3.33E-02
配列番号372	抗 -hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	配列番号1322	2.72E-04	> 3.33E-02	2.21E-04	> 3.33E-02
配列番号374	抗 -hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	配列番号1323	2.54E-04	4.88E-04	1.95E-04	> 3.33E-02
配列番号376	抗 -hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	配列番号1324	2.58E-04	7.20E-04	1.69E-04	> 3.33E-02
配列番号377	抗 -hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	配列番号1325	2.45E-04	3.68E-04	1.84E-04	> 3.33E-02
配列番号378	抗 -hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	配列番号1326	2.58E-04	4.76E-04	1.57E-04	> 3.33E-02
配列番号	抗 -hHER2-HC-G194-	配列番号	2.51E-04	4.93E-04	1.67E-04	> 3.33E-02

【表２４－８】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 クローン16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231クローン40 IC_{50} (μM)[b]
380	GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	1327				
配列番号381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	配列番号1328	2.44E-04	4.39E-04	1.36E-04	> 3.33E-02
配列番号383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	配列番号1329	2.12E-04	3.19E-04	1.26E-04	> 3.33E-02
配列番号384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	配列番号1330	2.24E-04	3.54E-04	1.60E-04	> 3.33E-02

[a] 名称は、ペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を、結合された化合物と共に表し、対の野生型鎖は列挙されていない。
[b] 33nMが、IC_{50}細胞殺滅アッセイにおいて使用した最高濃度であった。
n.d.=未決定。

【０６０５】

良好な薬物動態特性がＡＤＣのインビボ有効性には必須である（Hamblettら、Clin Cancer Res.、10:7063～7070 (2004); Alleyら、Bioconjug. Chem. 19:759～765 (2008)）。抗体とのＣｏＡ－ＭＣ－ＭＭＡＦ分子のコンジュゲーションは、その生物物理学的特性に負の影響を及ぼし得、その結果、対応するＡＤＣの迅速なクリアランスおよびインビボ有効性の劇的な低下が生じ得る（Hamblettら、2004）。インビボクリアランスおよびＡＤＣインビボ安定性に対するコンジュゲーション部位の作用を評価するために、薬物動態（ＰＫ）研究を、非担腫瘍マウスにおいて、８６種のペプチドタグ付きトラスツズマブＡＤＣ（表２５）で行った。

【０６０６】

各ペプチドタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣを、３匹のマウスに１ｍｇ／ｋｇの単回用量で静脈内注射した。次いで、９つの血漿試料を３４０時間の時間経過にわたって収集し、その後、ＡＤＣの血漿力価をＥＬＩＳＡによって決定した。ＥＬＩＳＡアッセイでは、血漿試料からトラスツズマブＡＤＣ分子を捕捉するために、固定化されたヒトＨＥＲ２の細胞外ドメインを使用する。このアッセイの捕捉ステップの後に、抗ＭＭＡＦ抗体を使用して、「無傷」のトラスツズマブＭＭＡＦコンジュゲートの血漿中濃度を専ら測定する。第２ＥＬＩＳＡ実験において、抗ｈＩｇＧ抗体は、コンジュゲートおよび非コンジュゲートトラスツズマブ分子の両方の血漿中濃度を示すシグナルを生成する。ＡＤＣのペイロード脱コンジュゲーションがインビボで起こらなければ、抗ＭＭＡＦおよび抗ｈＩｇＧ　ＥＬＩＳＡは両方とも、ＡＤＣ血漿中濃度において同一の読み出し情報をもたらすと予測される。しかしながら、インビボでペイロードが喪失した場合には、抗ＭＭＡＦ　ＥＬＩＳＡは、抗ｈＩｇＧ　ＥＬＩＳＡよりも低いシグナルを生成すると予測される。したがって、両方のＥＬＩＳＡシグナルを比較することで、個々のＡＤＣのインビボ曝露の間のペイロード脱コンジュゲーションの定量化が可能となる。ＰＫデータの解釈は、マウスに静脈内注射するために使用したのと同じＡＤＣで生成された標準曲線に基づく。

【０６０７】

血漿中濃度－時間曲線下面積（ＡＵＣ）は重要な薬物動態パラメータであり、これを使用して、投与された生体治療薬の総クリアランスおよび生物学的利用能を決定することができる。各ペプチドタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣについて、２つの特徴的なＡＵＣ値、ＡＵＣ　ｈＩｇＧおよびＡＵＣ　ＭＭＡＦをそれぞれ抗ｈＩｇＧおよび抗ＭＭＡＦ　ＥＬＩＳ

Ａ実験によって得た。表２５に、検査した８６種のペプチドタグ付きＡＤＣのＡＵＣ　ｈＩｇＧおよびＡＵＣ　ＭＭＡＦ値、さらには、それらの個々の比をまとめる。得られたＡＵＣ　ｈＩｇＧ値は幅広い範囲にわたって広がり、３２５５３ｎＭ・ｈｒの最高値は、１３６２ｎＭ・ｈｒの最低値よりも約３０倍高く、平均は１６９３５ｎＭ・ｈｒであった。図２０Ａ～Ｃは、高いＡＵＣ　ｈＩｇＧ値を示す３種のペプチドタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣのＰＫ曲線を例示している（配列番号２４８のＡＤＣ、２８３３４ｎＭ・ｈｒ；配列番号３３のＡＤＣ、２１０１１ｎＭ・ｈｒ；配列番号２５１のＡＤＣ、２１６８９ｎＭ・ｈｒ）。逆に、低いＡＵＣ　ｈＩｇＧ値を示す３種の構築物のＰＫ曲線（配列番号２１８のＡＤＣ、１３６２ｎＭ・ｈｒ；配列番号２０２のＡＤＣ、１７５７ｎＭ・ｈｒ；配列番号２４４のＡＤＣ、２３７８ｎＭ・ｈｒ）は図２０Ｄ～Ｆに示す。ＡＵＣ　ｈＩｇＧ値の大きな変動にも関わらず、抗ｈＩｇＧおよび抗ＭＭＡＦ力価は両方とも、互いに跡をたどっていて、このことは、もしあるとしても、ペイロード脱コンジュゲーションがインビボでほとんど起こらなかったことを示唆している。さらに、検査した８６種すべてのペプチドタグ付きＡＤＣのＡＵＣ　ＭＭＡＦ値とＡＵＣ　ｈＩｇＧ値との間の比は、１．０±０．１（ＡＵＣ（ＭＭＡＦ）／ＡＵＣ（ｈＩｇＧ）±標準偏差、表２５および図２１を参照されたい）と平均され、このことは、ＭＣ－ＭＭＡＦと４’－ホスホパンテテイン（ｐｐａｎ）部分の末端チオールとの間でのマレイミドをベースとした連結は、ＰＫ実験の時間経過にわたって、循環中で安定なままであったことを示唆している。同様に、これらの結果は、ｐｐａｎ補欠分子族と、挿入されたＳ６／ｙｂｂＲ／Ａ１ペプチドタグのセリン残基との間でのホスホジエステルをベースとする連結の高いインビボ安定性も示している。

【０６０８】

ペプチドタグ付きＡＤＣのうちの一部について観察された迅速なクリアランスはおそらく、薬物結合の結果というよりも、Ｓ６、Ａ１、またはｙｂｂＲペプチド配列がＩｇＧ１分子の特異的な領域に挿入されたことの結果である。タグ挿入部位と薬物動態プロファイルとの間の推定上の関係を、それぞれ１３６２ｎＭ・ｈｒおよび１７５７ｎＭ・ｈｒの最も低い、および三番目に低い測定ＡＵＣ　ｈＩｇＧ値を示す配列番号２１８および配列番号２０２の２種のペプチドタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣによって例示する。両方のＡＤＣが、重鎖のＣＨ２ドメインにＳ６タグを含有する。マウス循環における不安定性に加えて、これらのＡＤＣは、ＰＫ研究の検査した８６種の試料のうちで、５番目に低い、および９番目に低い熱安定性も示す。ＤＳＦ測定によれば、対応するＡＤＣは、４９．０℃のＴｍ１（配列番号２１８のＡＤＣ）および５１．２℃のＴｍ１（配列番号２０２のＡＤＣ）を示し、結果として、６９．７℃のＴｍ１を有する野生型トラスツズマブと比較してそれぞれ２０．７℃および１８．５℃の低下を生じた。逆に、最も高いＡＵＣ　ｈＩｇＧ値（１９６９５～３２５５３ｎＭ・ｈｒ）を有する４０種のＡＤＣは、６７．４℃の平均Ｔｍ１値を示し、これは、野生型トラスツズマブのＴｍ１をわずか２．３℃下回るだけであり、このことは、ＡＤＣの薬物動態と熱安定性との間にあり得る相関を示唆している。さらに、これらの４０種のＡＤＣのうちの２６種は、重鎖のＣＨ１ドメインのループ領域にＳ６、ｙｂｂＲ、またはＡ１タグを含有する。上述のとおり、これらの好ましい部位でのペプチドタグ挿入は、最良の全体コンジュゲート効率も示し、それらをＡＤＣ生成のための好ましい候補としている。これらには、配列番号１２６、１２７、１２９、１３０、１３１、１３２、１４９、１５１、１５２、１５７、１５８、１６０、１６６、１６８、１６９、１７８、１７９、２５０、２５１、２５６、２５７、２５９、２６５、２６７、２６８、２７７、２７８、３５６、３５８、３５９、３６４、３６５、３６７、３７１、３７３、３７４、３８０、および３８１に対応する、Ｓ１１９～Ｔ１２０、Ｔ１２０～Ｋ１２１、Ｔ１３５～Ｓ１３６、Ｓ１３６～Ｇ１３７、Ｇ１３８～Ｔ１３９、Ａ１６２～Ｌ１６３、Ｔ１６４～Ｓ１６５、Ｓ１６５～Ｇ１６６、Ｇ１９４～Ｔ１９５、Ｔ１９５～Ｑ１９６、およびＥ３８８～Ｎ３８９（ＣＨ３ドメイン）の間に重鎖挿入を伴う抗体が含まれる。

【０６０９】

【表２５－１】
表25. 薬物動態データ

抗体 配列番号	ADC名称[a]	ADC 配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
配列番号 151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	配列番号 1137	22485	21693	1.0
配列番号 152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	配列番号 1138	13880	12542	0.9
配列番号 157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	配列番号 1139	21494	16931	0.8
配列番号 158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	配列番号 1140	22833	23533	1.0
配列番号 166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	配列番号 1147	11178	10981	1.0
配列番号 168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	配列番号 1148	20916	22125	1.1
配列番号 169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	配列番号 1149	23242	21304	0.9
配列番号 173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	配列番号 1152	8922	8840	1.0
配列番号 178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	配列番号 1156	20702	18593	0.9

【表２５－２】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
配列番号179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	配列番号1157	16083	17465	1.1
配列番号202	抗-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	配列番号1172	1757	1550	0.9
配列番号218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	配列番号1181	1362	1768	1.3
配列番号220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	配列番号1182	17396	16060	0.9
配列番号221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	配列番号1183	9214	10336	1.1
配列番号224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	配列番号1186	15196	16061	1.1
配列番号229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	配列番号1187	7867	8209	1.0
配列番号127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	配列番号1118	14224	14887	1.0
配列番号239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	配列番号1195	8561	6136	0.7
配列番号244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	配列番号1197	2378	2249	0.9
配列番号248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	配列番号1199	28334	24130	0.9
配列番号250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	配列番号1201	22854	24551	1.1
配列番号251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	配列番号1202	21689	19734	0.9
配列番号257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	配列番号1203	27232	24064	0.9
配列番号259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	配列番号1204	17184	15404	0.9
配列番号268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	配列番号1209	12794	13854	1.1

【表２５－３】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
配列番号277	抗-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	配列番号1215	20659	21603	1.0
配列番号315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	配列番号1243	7590	8039	1.1
配列番号317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	配列番号1245	12960	14302	1.1
配列番号129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	配列番号1122	21023	21257	1.0
配列番号349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	配列番号1270	20329	16452	0.8
配列番号32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	配列番号1272	17358	18734	1.1
配列番号33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	配列番号1273	21011	20711	1.0
配列番号46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	配列番号1284	15444	17657	1.1
配列番号48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	配列番号1251	11348	11645	1.0
配列番号56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	配列番号1292	16832	17973	1.1
配列番号63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	配列番号1294	20373	24757	1.2
配列番号64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	配列番号1295	16092	16196	1.0
配列番号75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	配列番号1305	18406	19496	1.1
配列番号89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	配列番号1316	17223	15036	0.9
配列番号330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	配列番号1256	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	配列番号1167	5657	6480	1.1

【表２５－４】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
配列番号206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	配列番号1173	23692	29456	1.2
配列番号288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	配列番号1221	24430	27937	1.1
配列番号249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	配列番号1200	22713	19408	0.9
配列番号323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	配列番号1251	16731	19050	1.1
配列番号322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	配列番号1250	18942	22948	1.2
配列番号301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	配列番号1233	6651	7233	1.1
配列番号279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	配列番号1217	20702	24082	1.2
配列番号293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	配列番号1226	2447	2783	1.1
配列番号194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	配列番号1166	1609	1872	1.2
配列番号337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	配列番号1261	20158	21424	1.1
配列番号201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	配列番号1171	2566	2414	0.9
配列番号265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	配列番号1207	26501	27992	1.1
配列番号274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	配列番号1213	21971	25264	1.1
配列番号275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	配列番号1214	25220	27786	1.1
配列番号177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	配列番号1155	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	配列番号1227	2435	2514	1.0

【表２５－５】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
配列番号199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	配列番号1169	1916	1927	1.0
配列番号198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	配列番号1168	2481	2631	1.1
配列番号189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	配列番号1163	15932	15515	1.0
配列番号223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	配列番号1185	16217	17009	1.0
配列番号193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	配列番号1165	3203	2996	0.9
配列番号182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	配列番号1160	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	配列番号1228	3036	2834	0.9
配列番号278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	配列番号1216	23422	25475	1.1
配列番号150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	配列番号1136	14235	12465	0.9
配列番号185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	配列番号1161	18890	18982	1.0
配列番号47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	配列番号1285	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	配列番号1317	18663	19769	1.1
配列番号60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	配列番号1318	26363	31434	1.2
配列番号61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	配列番号1319	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	配列番号1320	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	配列番号1282	22890	25331	1.1

【表２５－６】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
配列番号267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	配列番号1208	23675	24973	1.1
配列番号176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	配列番号1154	21492	20712	1.0
配列番号180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	配列番号1158	19695	19974	1.0
配列番号175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	配列番号1153	18430	16233	0.9
配列番号341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	配列番号1265	32553	34202	1.1
配列番号289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	配列番号1222	14771	16398	1.1
配列番号342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	配列番号1266	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	配列番号1283	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	配列番号1193	15181	18255	1.2
配列番号187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	配列番号1162	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	配列番号1141	21276	24046	1.1
配列番号372	抗-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	配列番号1322	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号374	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	配列番号1323	21008	23328	1.1
配列番号376	抗-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	配列番号1324	n.d.	n.d.	n.d.
配列番号377	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	配列番号1325	27588	28786	1.0
配列番号378	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	配列番号1326	27124	24221	0.9

【表２５－７】

抗体配列番号	ADC名称[a]	ADC配列番号	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF)/AUC(hIgG)
配列番号380	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	配列番号1327	23858	27185	1.1
配列番号383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	配列番号1329	21940	19449	0.9
配列番号299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	配列番号1231	12525	14829	1.2
配列番号300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	配列番号1232	12981	14803	1.1
配列番号77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	配列番号1307	30628	33193	1.1
配列番号370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	配列番号1321	23116	25913	1.1
配列番号381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	配列番号1328	25023	26308	1.1
配列番号384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	配列番号1330	27475	31910	1.2

[a] 名称は、ペプチドタグを含有するHCまたはLCの部分を、結合された化合物と共に表し、対の野生型鎖は列挙されていない。
[b] 抗ヒトIgG ELISAによって測定された曲線下面積
[c] 抗MMAF ELISAによって測定された曲線下面積
n.d.=未決定.

【実施例２７】

【０６１０】

細胞培地中での同時発現４’－ホスホ－パンテテイニルトランスフェラーゼでのペプチドタグ付きＩｇＧの標識

ＡＤＣの調製プロセスを合理化するために、同時発現４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ（ＰＰＴアーゼ）でのペプチドタグ付き抗体の酵素的標識を、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で実施した。精製ステップの数の低減に加えて、抗体生成の間にＰＰＴアーゼが同時発現することによって、そのような酵素の添加および組換え産生されたバージョンの除去に関連する問題を回避し得た。概念証明として、大腸菌（E. coli）からのＡｃｐＳ　ＰＰＴアーゼを使用して、Ａ１タグ付き抗体をアセチル補酵素Ａ（アセチルＣｏＡ）と、細胞培地中で部位特異的にコンジュゲートした。

【０６１１】

同時発現を促進するために、ＡｃｐＳ　ＰＰＴアーゼをコードする遺伝子を、Ｎ末端シグナル配列ＭＫＴＦＩＬＬＬＷＶＬＬＬＷＶＩＦＬＬＰＧＡＴＡ（配列番号３５５）を追加する哺乳動物用発現ベクターｐＲＳにクローニングした。構築物、ｐＲＳ－ＡｃｐＳも、Ｃ末端$Ｈｉｓ_{6}$タグを組換え酵素（配列番号１１０６）に追加する。Ａ１タグ付き抗体ｍＡｂ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ－Ｎ３８９（配列番号３５６）を同時発現させるために、１２－アミノ－酸Ａ１ペプチド配列をコードするオリゴヌクレオチド断片を、抗体ｍＡｂ２－ＨＣ（配列番号１４７）の重鎖遺伝子に、哺乳動物用発現ベクターｐＭ４中で挿入し、結果として、構築物ｐＭ４－Ａ１を生じさせた。このプラスミ

ドは、ＣＭＶプロモーター下で、対応する軽鎖も同時発現する。ＰＥＩ法（Meissnerら、2001）を使用して、２９３個のＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）細胞に組換え発現プラスミドｐＭ４－Ａ１およびｐＲＳ－ＡｃｐＳの１：１混合物を過渡的に形質移入し、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）２００ｍＬの５つのアリコット中、３７℃にて５％CO_2下で５日間培養した。次に、細胞培養物を、２，０００ｒｐｍで１０分間の遠心分離によって採集し、０．２２μｍフィルターに通し、貯留した。細胞培地中での効率的なコンジュゲート形成に必要な最少抗体および酵素濃度を決定するために、濾液のアリコットを未濃縮のままにするか、または３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ遠心濾過ユニット（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して２倍、５倍、１０倍、および２０倍に濃縮した。濃縮試料を３，７２４×ｇで２分間遠心分離して、沈澱物を除去した。ＡｃｐＳ触媒作用のための細胞培地条件を最適化するために、すべての試料に、１０倍反応緩衝液（ｐＨ８．８）を、７５ｍＭのトリス－ＨＣｌおよび１０ｍＭの$MgCl_2$の最終濃度まで補充した。次いで、標識反応を、アセチルＣｏＡ基質（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を１ｍＭの最終濃度まで加えることによって開始した。結果として１．５ｍＬ～１５ｍＬの体積で生じた反応混合物を３７℃にて約１６時間インキュベートした。

【０６１２】

Ａ１タグ付き抗体の標識度を決定し、さらに、酵素および抗体の両方の発現レベルを定量化するために、すべての反応混合物をそれぞれＮｉ－ＮＴＡおよびタンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。未濃縮試料を除いて、すべての反応混合物をＰＢＳで２倍に希釈し、その後、ＰＢＳ平衡化タンパク質Ａ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（床体積０．５ｍＬ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にほぼ１ｍＬ／分の流速で負荷した。カラムフロースルーをそのまま、Ｎｉ－ＮＴＡアガロース（Ｑｉａｇｅｎ）０．５ｍＬを充填されたＰＢＳ平衡化ＩＭＡＣカラムに注入した。すべてのタンパク質ＡおよびＮｉ－ＮＴＡアフィニティーカラムを、３００ｍＭのＮａＣｌおよび２０ｍＭのイミダゾールを補充した５０ｍＭトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８）４０カラム体積で洗浄した。His_6タグ付き（配列番号１１０６）ＡｃｐＳ酵素をＮｉ－ＮＴＡアフィニティーカラムから、３００ｍＭのＮａＣｌおよび２５０ｍＭのイミダゾールを含有する５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８）６カラム体積で溶離した。同様に、Ａ１タグ付き抗体をタンパク質Ａアフィニティーカラムから、０．１Ｍ酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ３．０）６カラム体積で溶離し、直後に、１Ｍのトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ１０）１２％（ｖ／ｖ）で中和した。

【０６１３】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＥＳＩ－ＭＳによって、ＡｃｐＳ酵素およびＡ１タグ付き抗体の溶離をそれぞれ確認した。ＵＶ－Ｖｉｓおよびブラッドフォード測定によって、Ａ１タグ付き抗体０．１７ｍｇ～０．３４ｍｇおよびＡｃｐＳ酵素０．１２ｍｇ～０．１５ｍｇが回収されたことが示された（表２６）。このことは、抗体濃度は、アセチルＣｏＡでの標識反応の間、未濃縮細胞培地における０．０８μＭ（１３ｍｇ／Ｌ）から、２０倍濃縮細胞培地における１．５μＭ（２３０ｍｇ／Ｌ）までの範囲であることを示唆している。したがって、Ａ１タグ付き抗体の濃度は、細胞培地の濃縮係数にほぼ比例する。同様に、ＡｃｐＳ ＰＰＴアーゼの濃度は、未濃縮細胞培地における０．６μＭ（９ｍｇ／Ｌ）から、２０倍濃縮細胞培地における６．８μＭ（１００ｍｇ／Ｌ）まで上昇した。

【０６１４】

【表２６】
表26. mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389(配列番号356)およびAcpS PPTアーゼの発現収量、さらに細胞培地中での酵素的標識の質量分光評価

細胞培地の濃縮係数	AcpS PPTアーゼ収量(mg)[a]	培地中標識の間のAcpS濃度(μM)	mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389(配列番号356)の収量(mg)[b]	培地中標識の間の抗体濃度(μM)	観察質量(Da)	期待質量(Da)[c]
1 x	0.14	0.6	0.19	0.08	51927.89 51587.6	脱共役、51589.2 共役、51971.6 共役および脱アセチル化、51929.6
2 x	0.12	1.1	0.17	0.16	51927.56	
5 x	0.14	1.9	0.31	0.41	51927.94	
10 x	0.14	3.8	0.32	0.85	51927.94	
20 x	0.15	6.8	0.34	1.5	51928.1	

[a] ブラッドフォード分析による培養液 13mL(濃縮係数 1×)、12mL(濃縮係数 2×)、22mL(濃縮係数 5～10×)、および 26mL(濃縮係数 20×)からの収量(2 回の測定の平均)
[b] NanoDrop ND-1000 分光光度計での UV-Vis 測定による収量(2 回の測定の平均)
[c] 期待質量は、シグナルペプチド切断後の重鎖の N 末端グルタミン残基のピログルタミン酸形成について示されている。

【０６１５】
精製された抗体構築物を、３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心濾過ユニットを使用して濃縮し、還元し、脱グリコシル化し、続いて、Ａｇｉｌｅｎｔ　６５２０　Ｑ－ＴＯＦ装置（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で質量分光分析した。表２６において示すとおり、馴化細胞培地の２倍濃縮係数が、１ｍＭのアセチルＣｏＡ基質、０．１６μＭ（２４ｍｇ／Ｌ）のＡ１タグ付き抗体、および１．１μＭ（１７ｍｇ／Ｌ）のＡｃｐＳ酵素が存在する状態でのほぼ定量的なコンジュゲーションには十分である。特に、アセチルＣｏＡ基質のアセチル基は、培地中標識の間に完全に切断除去され、それによって、馴化細胞培地中でのチオエステル結合の加水分解を示す。３０倍濃縮細胞培地での独立実験において、外因的に付加されたアセチルＣｏＡが存在しない状態では、コンジュゲート形成は質量分析法によって検出され得ないことが見出された。したがって、この陰性対照は、有意な量のＣｏＡまたはその類似体の１種が細胞培地中に存在することを否定するものである。

【０６１６】
まとめると、この実験は、ペプチドタグ付き抗体を、補充したＣｏＡ類似体で、２倍濃縮細胞培地中でＰＰＴアーゼ触媒作用によって定量的に標識することができることを実証している。生産セル系の発酵の間の抗体濃度は、現行の概念証明実験においてよりもかなり高いので、ペプチドタグ付き抗体との補充ＣｏＡ類似体の酵素的コンジュゲートを生産レベルまで大規模化し得ることが予測され得る。補充されるＣｏＡ類似体は、チオール基、保護チオール基、またはアルデヒド、ケト基、アジド基、もしくはアルキン基などの生体直交性反応性基を特徴とする。タンパク質Ａ精製の後に、反応性基で酵素的に活性化させた抗体を、相補的毒素類似体と反応させて、対応するＡＤＣを第２のステップにおいて得ることができる。

【実施例２８】
【０６１７】
細胞培地中でのケトンＣｏＡでのペプチドタグ付き抗体の部位特異的修飾
この実験の目的は、馴化細胞培地中で生体直交性基をペプチドタグ付き抗体に部位特異的に結合させることの実行可能性を実証することである。２ステップ法の第１ステップを、実施例２３にその合成を記載したケトンＣｏＡ類似体で実施した。このカルボニル官能化されたＣｏＡ類似体でのペプチドタグ付き抗体の培地中標識の成功によって、２ステッ

プ法の第２ステップにおける、オキシムライゲーションによるアミノオキシ官能化ペイロードのその後の結合が可能となるであろう（図２２も参照されたい）。

【０６１８】

ＰＥＩ法（Meissner ら、2001）を使用して、２９３個のＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）細胞に、実施例２７において記載した組換え発現プラスミドｐＭ４－Ａ１およびｐＲＳ－ＡｃｐＳの１：１混合物を過渡的に形質移入した。同時形質移入した哺乳動物細胞をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）４００ｍＬ中、３７℃にて５％CO_2下で５日間培養した後に、細胞培養物を２，０００ｒｐｍで１０分間の遠心分離によって採集し、０．２２μｍフィルターに通した。次に、透明細胞培地６０ｍＬのアリコットを、３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心濾過ユニット（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して２０倍濃縮した。３，７２４×ｇで５分間遠心分離することによって沈澱物を除去した後に、１ｍＭの最終濃度でケトンＣｏＡを含む濃縮物１．３１ｍＬならびに７５ｍＭのトリス－ＨＣｌおよび１０ｍＭの$MgCl_2$の最終濃度の１０倍反応緩衝液（ｐＨ８．８）を補充することによって、標識反応を開始した。１．５ｍＬの総体積の酵素反応物を３７℃にて約１６時間インキュベートした。

【０６１９】

カルボニル官能化されたＣｏＡ類似体での標識度を質量分析法によって分析する前に、反応混合物をタンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ＰＢＳでの２倍希釈の後に、希釈した反応混合物をＰＢＳ平衡化タンパク質Ａ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（床体積０．６ｍＬ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に、約１ｍＬ／分の流速で負荷した。カラムマトリックスをＰＢＳ約４０床体積で洗浄し、その後、残留物質を０．１Ｍ酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ３）６カラム体積で溶離した。最後に、溶離液を１Ｍのトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ１０）１２％（ｖ／ｖ）を加えることによって中和した。

【０６２０】

抗体の純度を、還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって評価した。ＮａｎｏＤｒｏｐ　ＮＤ－１０００分光光度計でのＵＶ－Ｖｉｓ測定によれば、抗体０．３４ｍｇが回収されたが、これは、２０倍濃縮細胞培地中の１．５μＭの抗体濃度（２３０ｍｇ／Ｌ）に対応した。これは、２０倍濃縮細胞培地中でのアセチルＣｏＡでの標識反応の間に測定された抗体濃度（実施例２７）を正確に再現している。ケトンＣｏＡでの抗体標識度を質量分析法によって評価するために、中和した溶離液を、３０ｋＤａカットオフＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心濾過ユニットを使用して濃縮し、脱グリコシル化し、還元した。Ａｇｉｌｅｎｔ　６５２０　Ｑ－ＴＯＦ装置での質量分光分析は、所望のカルボニル官能化された抗体コンジュゲート（観察値５１９９５．３２；期待値５１９９９．６）の形成を示し、その際、約２４％の副生成物としての４’－ホスホパンテテイン－修飾抗体（観察値５１９２５．４２；期待値５１９２９．６）の形成を伴った。非コンジュゲート抗体は、逆重畳積分質量スペクトルにおいては検出不可能であった（期待値５１５８９．２）。副生成物としての４’－ホスホパンテテイン－修飾抗体の存在は、ＣｏＡ－ＳＨとメチルビニルケトンとの反応の間のケトンＣｏＡの形成が不完全であることによって説明されるであろう（実施例２３）。

【０６２１】

実験結果は、馴化細胞培地中での抗体とのカルボニル基の部位特異的コンジュゲーションの実行可能性を示している。この手法は、アジドおよびアルキン部分などの他の生体直交性基にも適用することができる。そのような生体直交性基は、細胞培地において完全に不活性であり、相補性官能基を含有するペイロードとのみ専ら反応し、それによって、２ステップ法の第２ステップにおける均一なＡＤＣの形成を保証する。

【実施例２９】

【０６２２】

ｙｂｂＲタグ付きトラスツズマブMMAF　ＡＤＣのインビボ有効性評価

ｙｂｂＲタグ付きトラスツズマブＡＤＣである抗ｈＨＥＲ２－ＨＣ－Ｅ３８８－ＤＳ－ｐｐａｎ－ＭＣ－MMAF－ＬＥＦＩＡＳＫＬＡ－Ｎ３８９（配列番号１１２２）のイン

ビボ有効性を、免疫不全ヌードマウスへのヒト腫瘍細胞系の移植に基づく異種移植片腫瘍モデルを使用して評価した。すでに記載されているとおり（SausvilleおよびBurger、2006）、そのような腫瘍異種移植片マウスでの研究は、抗癌試薬のインビボ有効性に対する貴重な洞察をもたらしている。具体的には、インビボ有効性研究を、ＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６細胞を皮下注射されたｎｕ／ｎｕマウスで実施した（MortonおよびHoughton、2007）。この細胞系を、上述のｙｂｂＲタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣに対して抗原依存的にその高い感受性を明らかにした先行するインビトロ効力アッセイに基づき選択した（表２４を参照されたい）。腫瘍が約２００ｍｍ^{3}のサイズに達した後に、ｙｂｂＲタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣを、５ｍｇ／ｋｇまたは３ｍｇ／ｋｇのいずれかの単回用量で静脈内注射したが、その際、各処置群は９匹のマウスを含んだ。抗体－薬物コンジュゲートを投与した後に、腫瘍成長を毎週モニタリングした。図２３に示すとおり、ｙｂｂＲタグ付きＭＭＡＦ　ＡＤＣの静脈内投与は、両方の用量レベルで腫瘍の退縮をもたらした。さらに、ＡＤＣでのマウスの処置は、忍容性が良好で、いずれの処置群においても体重減少は観察されなかった。３ｍｇ／ｋｇの低い単回用量でのＭＤＡ－ＭＢ２３１クローン１６腫瘍の有効な退縮は、ｙｂｂＲタグ付きＡＤＣが、ＨＥＲ２依存性腫瘍マウスモデルにおいて有効であることを実証している。すべての動物研究を、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication; National Academy Press, 8th edition、2001)に従って行った。

本発明は、以下の態様を含む。

［１］

４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質であり、抗体またはその断片の構造的ループ内に設置されている少なくとも１個のペプチドタグを含む修飾抗体またはその断片。

［２］

前記４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼが、Ｓｆｐ、ＡｃｐＳ、Ｔ・マリティマ（T.maritima）ＰＰＴアーゼ、ヒトＰＰＴアーゼ、または４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を保持しているそれらの変異体または相同体型である、［１］に記載の修飾抗体またはその断片。

［３］

ペプチドタグが、

ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、

ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、

ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＣＬＮ（配列番号３）、

ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＣＬＮ（配列番号４）、

ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＬＬＮ（配列番号５）、

ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＳＬＮ（配列番号６）、

ＧＳＱＤＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号７）、

ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号８）、

ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、

ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、

ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、

ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、

ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、

ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、

ＧＤＳＬＤＭ（配列番号１５）、

ＬＤＳＶＲＭＭＡＬＡＡＲ（配列番号１６）、

ＬＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＲ（配列番号１７）、

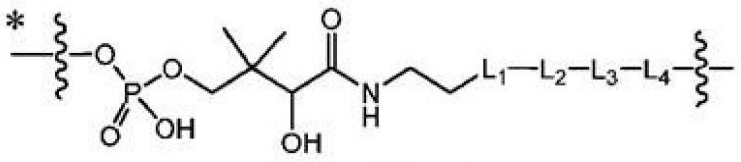
ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、

ＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）、

ＤＶＬＤＳＬＥＦＩ（配列番号２０）、
ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳ（配列番号２１）、および
ＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）
からなる群から選択される、［１］または［２］に記載の修飾抗体またはその断片。
［４］
ペプチドタグが、抗体またはその断片のＶＨ、ＶＬ、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、または$Ｃ_{Ｌ}$領域の構造的ループ内に設置されている、［１］から［３］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［５］
前記ペプチドタグが、抗体またはその断片のＣＨ１領域の構造的ループ内に設置されている、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［６］
前記ペプチドタグが、表１に列挙されている任意の２個のアミノ酸の間に挿入されている、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［７］
ペプチドタグが、親抗体またはその断片のＶＨまたはＶＬドメインのアミノ酸残基２および３の間に、または軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間に、またはＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６２および１６３の間、もしくは１６４および１６５の間、もしくは１６５および１６６の間、もしくは１９４および１９５の間、もしくは１９５および１９６の間に、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間、もしくは４４５および４４６の間、もしくは４４６および４４７の間に挿入されている、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［８］
ペプチドタグが、親抗体またはその断片の軽鎖のアミノ酸残基１１０および１１１の間に、ＣＨ１ドメインの１１９および１２０の間、もしくは１２０および１２１の間、もしくは１３５および１３６の間、もしくは１３６および１３７の間、もしくは１３８および１３９の間、もしくは１６２および１６３の間、もしくは１６４および１６５の間、もしくは１６５および１６６の間、もしくは１９４および１９５の間、もしくは１９５および１９６の間に、またはＣＨ３ドメインの３８８および３８９の間に挿入されている、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［９］
ペプチドタグが、$Ｖ_{Ｈ}$ドメインのアミノ酸残基６２～６４もしくは６２～６５の間に、またはＣＨ１ドメインのアミノ酸残基１３３～１３８の間に、またはＣＨ１ドメインの１８９～１９５の間に、またはＣＨ１ドメインの１９０～１９７の間にグラフトされている、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１０］
前記抗体が、配列番号２６、配列番号２７、配列番号３２、配列番号６３、配列番号９４、配列番号９５、配列番号９６、配列番号１２６、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３０、配列番号１３１、配列番号１３２、配列番号１３９、配列番号１４９、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６６、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号２４８、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６５、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号３４８、配列番号３４９、配列番号３５６、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７１、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８１、配列番号３８４、配列番号３８６、配列番号３８７、または配列番号３８８を含む、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。

［１１］
前記抗体が、配列番号３２、配列番号６３、配列番号１２７、配列番号１２９、配列番号１３２、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５７、配列番号１５８、配列番号１６０、配列番号１６６、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７８、配列番号１７９、配列番号２５０、配列番号２５１、配列番号２５６、配列番号２５７、配列番号２５９、配列番号２６５、配列番号２６７、配列番号２６８、配列番号２７７、配列番号２７８、配列番号３５８、配列番号３５９、配列番号３６４、配列番号３６５、配列番号３６７、配列番号３７１、配列番号３７３、配列番号３７４、配列番号３８０、配列番号３８１、または配列番号３８４を含む、［１］から［４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１２］
４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素がＳｆｐであり、ペプチドタグが、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＣＬＮ（配列番号３）、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＣＬＮ（配列番号４）、ＧＤＳＬＳＷＬＶＲＬＬＮ（配列番号５）、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＳＬＮ（配列番号６）、ＧＳＱＤＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号７）、ＶＬＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、ＬＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＲ（配列番号１７）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）、ＤＳＬＥＦＩＡＳ（配列番号１１１６）、またはＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）である、［１］から［１１］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１３］
４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素がＳｆｐであり、ペプチドタグが、ＧＤＳＬＳＷＬＬＲＬＬＮ（配列番号１）、ＧＤＳＬＳＷＬ（配列番号２）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬＡ（配列番号９）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＤＳＬＥＦＩＡＳＫＬ（配列番号１８）、またはＤＳＬＥＦＩＡＳＫ（配列番号１９）である、［１］から［１２］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１４］
４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ活性を有する酵素がＡｃｐＳであり、ペプチドタグが、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＭ（配列番号１０）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷＳ（配列番号１２）、ＧＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１３）、ＤＳＬＤＭＬＥＷ（配列番号１４）、ＧＤＳＬＤＭ（配列番号１５）、ＬＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬＲ（配列番号１７）、またはＤＳＬＤＭＬＥＷＳＬ（配列番号１１３２）である、［１］から［１１］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１５］
ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、およびＩｇＡから選択されるアイソタイプである、［１］から［１４］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１６］
ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４から選択されるＩｇＧのサブタイプである、［１］から［１５］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１７］
ヒトもしくはヒト化抗体またはその断片である、［１］から［１６］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片。
［１８］
抗ＨＥＲ２抗体または抗ＨＥＲ２抗体断片である、［１７］に記載の修飾抗体またはその断片。
［１９］
［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体または断片と末端基とを含む免疫コン

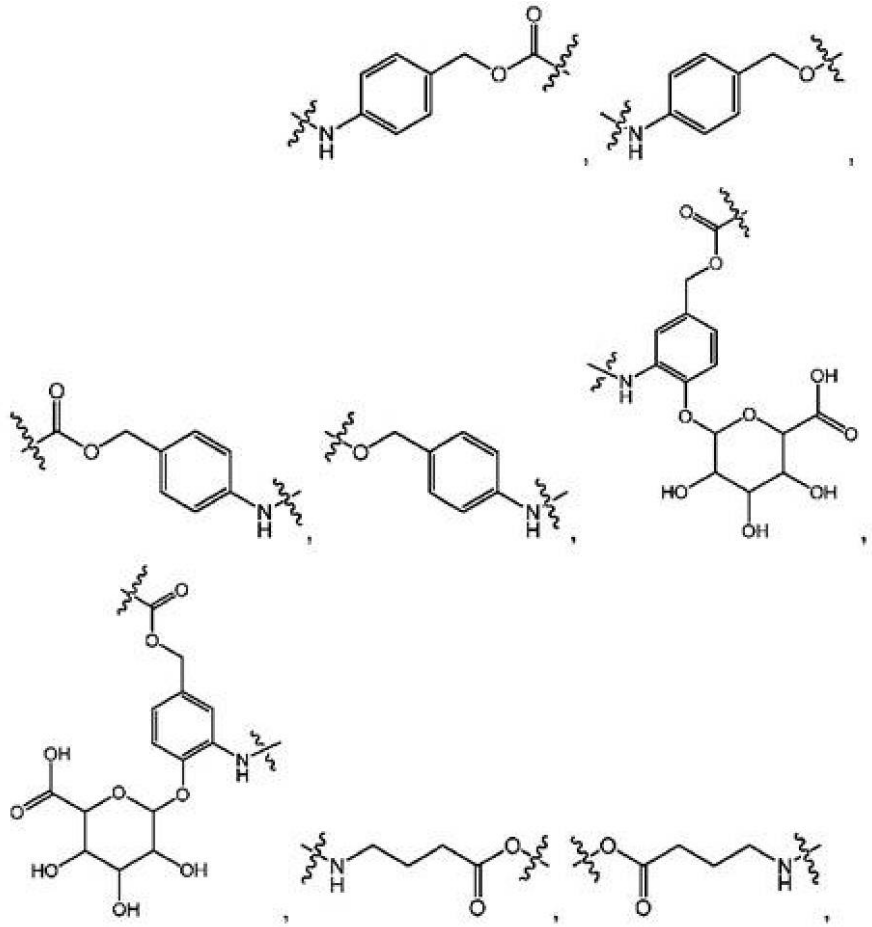
ジュゲート。
［２０］
前記末端基が、修飾抗体または抗体断片に、式（Ｉ－ｂ）による構造を有するリンカー：
【化２０８】



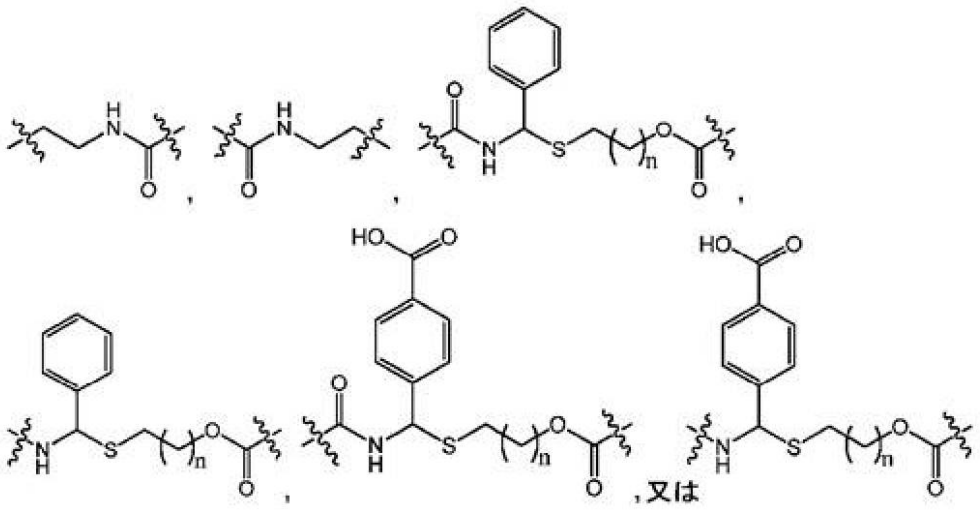
式(I－b)

［式中、
Ｌ$_1$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、
Ｌ$_2$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、
Ｌ$_3$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、または光切断可能なリンカーであり、
Ｌ$_4$は、結合、非酵素的に切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー；酵素的に切断可能なリンカー、光安定性のリンカー、光切断可能なリンカー、または自壊的スペーサーであり、
＊は、４’－ホスホパンテテイニル部分がペプチドタグに結合している場所を示す］によって結合しており、
末端基が、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、アセチル基、または表面である、［１］９に記載の免疫コンジュゲート。
［２１］
Ｌ$_1$が、－Ａ$_1$Ｘ^2－または－Ｘ^2－であり、
Ｌ$_2$が、結合、－Ａ$_2$－、または－Ａ$_2$Ｘ^2－であり、
Ｌ$_3$が、結合、－Ａ$_3$－、または－Ａ$_3$Ｘ^2－であり、
Ｌ$_4$が、結合、－Ａ$_4$－、－Ａ$_4$Ｘ^2－、

【化２０９－１】



【化２０９－２】



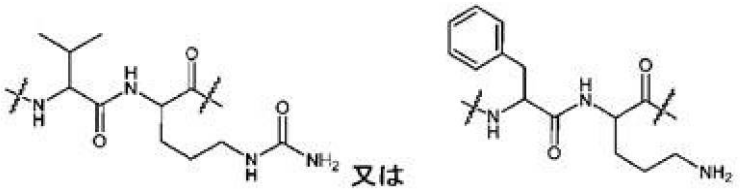
であり、

Ａ$_1$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ

－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－であり、

Ａ$_{2}$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{4}－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、

【化２１０】

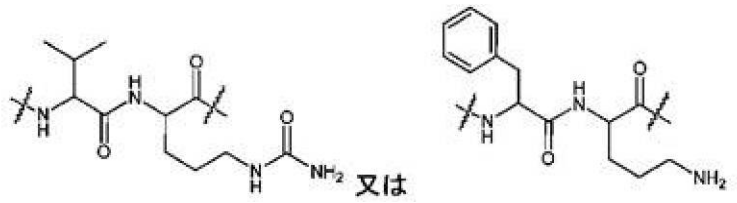


であり、

Ａ$_{3}$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$－、－（（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－（（（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｏ）$_{m}$Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^{4}）$_{2}$）$_{n}$

－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、

【化２１１】

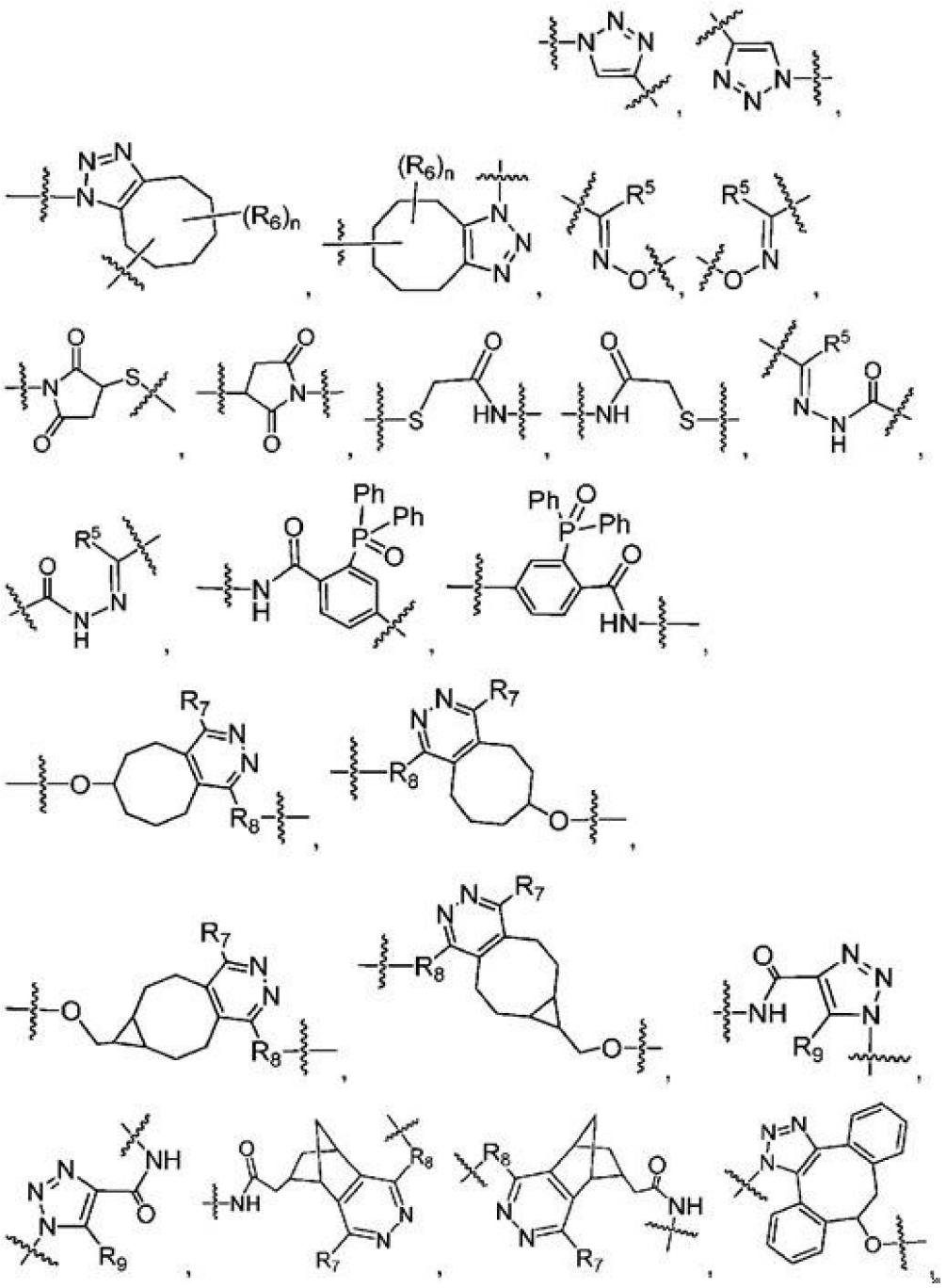


であり、

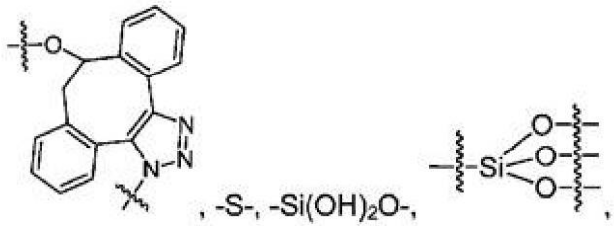
Ａ$_4$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_2$）$_n$（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（Ｒ^4）$_2$）$_n$－であり、

各Ｘ^{2}は、独立に、結合、

【化２１２】



【化２１３】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

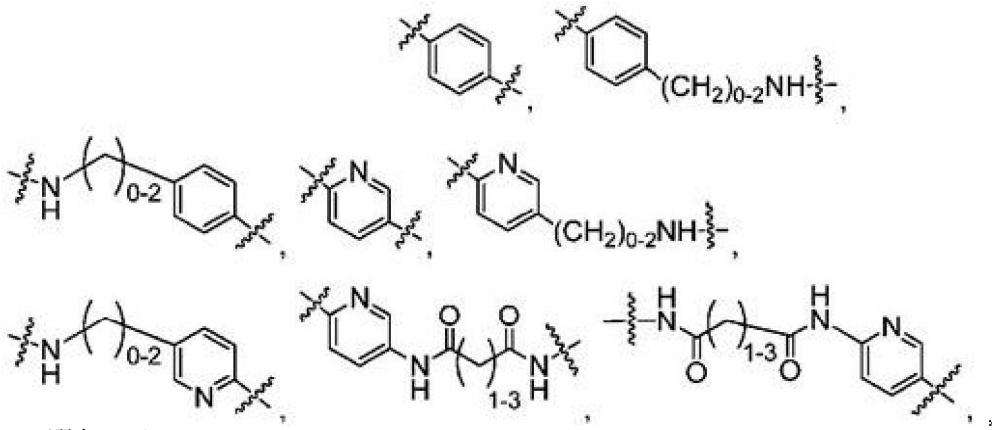
各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

各R^6は、独立に、H、フルオロ、－C（＝O）OHで置換されているベンジルオキシ、－C（＝O）OHで置換されているベンジル、－C（＝O）OHで置換されている$C_{1\sim4}$アルコキシ、および－C（＝O）OHで置換されている$C_{1\sim4}$アルキルから選択され、

R^7は、独立に、H、フェニルおよびピリジンから選択され、

R^8は、独立に、

【化２１４】



から選択され、

R^9は、独立に、HおよびC$_{1\sim6}$ハロアルキルから選択され、

各nは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

各mは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される、［２０］に記載の免疫コンジュゲート。

［２２］

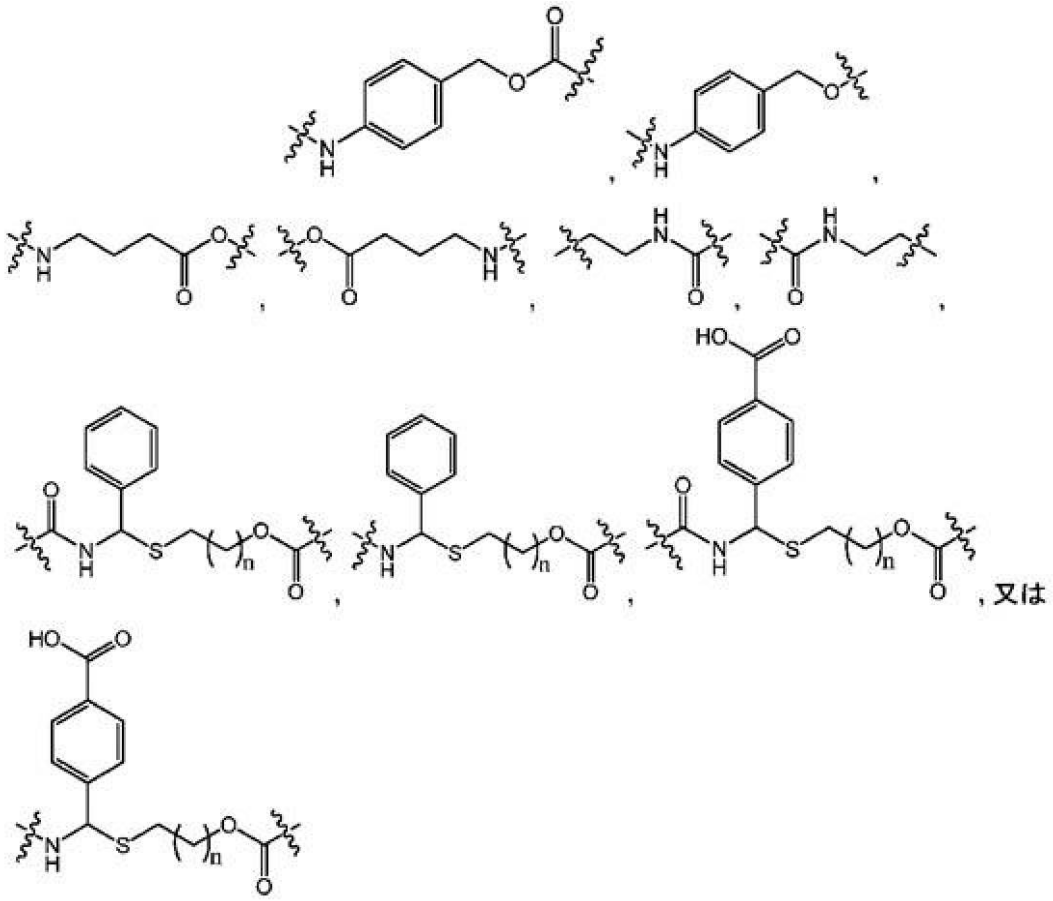
L_1が、$-A_1X^2-$または$-X^2-$であり、

L_2が、結合、$-A_2-$、または$-A_2X^2-$であり、

L_3が、結合、$-A_3-$、または$-A_3X^2-$であり、

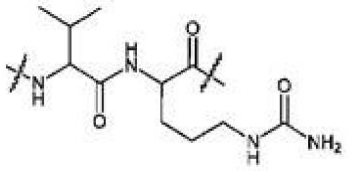
L_4が、結合、$-A_4-$、$-A_4X^2-$、

【化２１５】



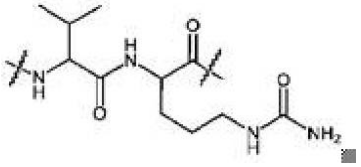
であり、
Ａ$_1$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－または－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、
Ａ$_2$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－または

【化２１６】



であり、
Ａ$_3$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－または

【化２１７】

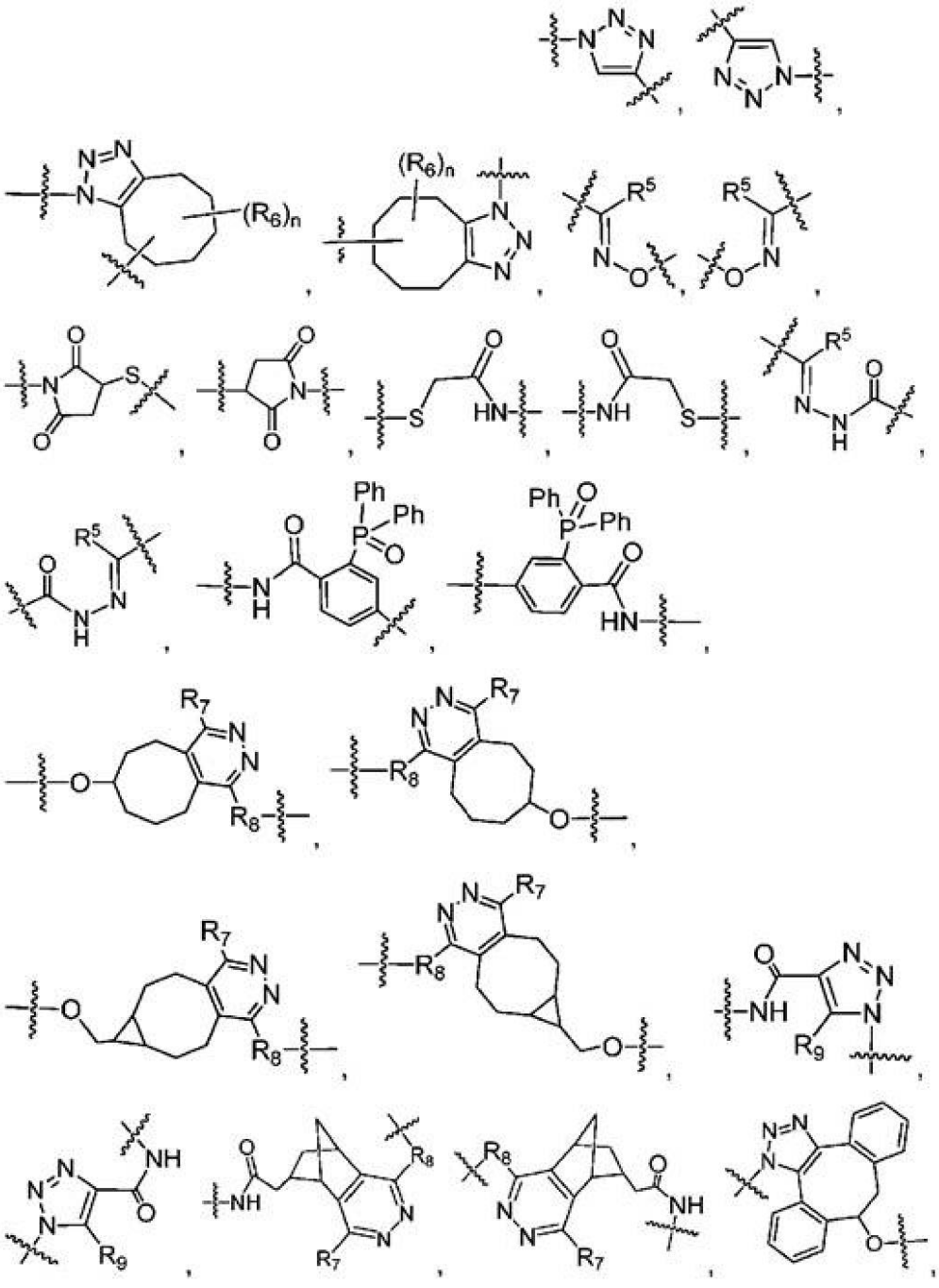


であり、

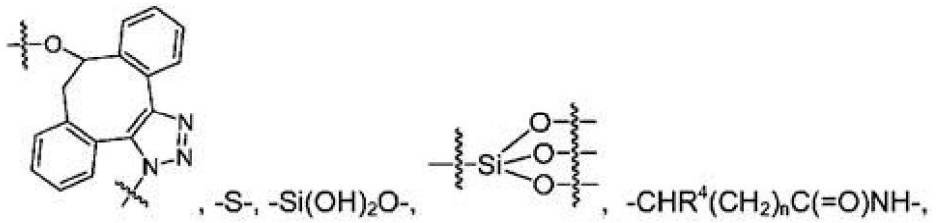
Ａ$_4$が、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$Ｓ－、－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$－、－（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ（（ＣＨ$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（ＣＨ$_2$）$_n$－または－（Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、

各Ｘ^{2}が、独立に、結合、

【化２１８】



【化２１９】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}が、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

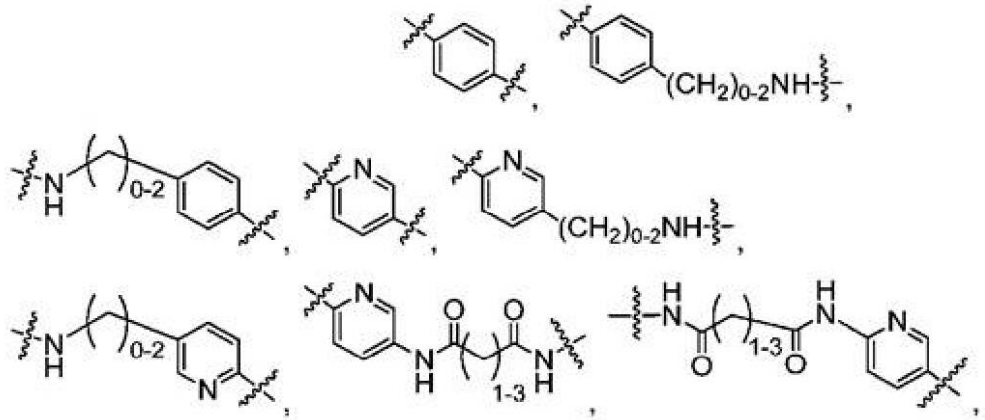
各Ｒ^{5}が、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

各Ｒ^{6}が、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}が、独立に、Ｈ、フェニルおよびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}が、独立に、

【化２２０】



から選択され、

Ｒ^{9}が、独立に、ＨおよびＣ$_{1}$～$_{6}$ハロアルキルから選択され、

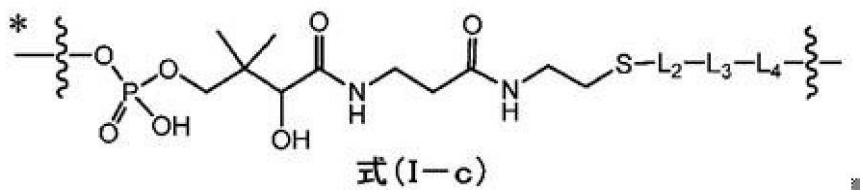
各ｎが、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

各ｍが、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択される、［２０または２１に記載の免疫コンジュゲート。

［２３］

式（Ｉ－ｂ）のリンカーが、式（Ｉ－ｃ）による構造を有するリンカー：

【化２２１】

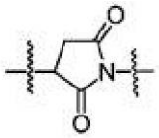


である、［２０］から［２２］に記載の免疫コンジュゲート。

［２４］

Ｌ$_{1}$が－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－であり、この際、Ａ$_{1}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－であり、Ｘ^{2}は、

【化２２２】



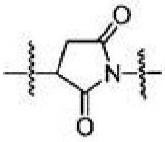
であり、

Ｌ$_{2}$が結合であり、Ｌ$_{3}$が結合であり、Ｌ$_{4}$が－Ａ$_{4}$－であり、この際、Ａ$_{4}$は－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。

［２５］

Ｌ$_{1}$が－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－であり、この際、Ａ$_{1}$は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－であり、Ｘ^{2}は、

【化２２３】



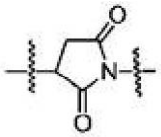
であり、

Ｌ$_{2}$が結合であり、Ｌ$_{3}$が結合であり、Ｌ$_{4}$が－Ａ$_{4}$－であり、この際、Ａ$_{4}$は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）－である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。

［２６］

Ｌ$_{1}$が－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－であり、この際、Ａ$_{1}$は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－であり、Ｘ^{2}は

【化２２４】

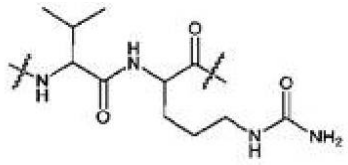


であり、

Ｌ$_{2}$が－Ａ$_{2}$－であり、この際、Ａ$_{2}$は－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏであり、

Ｌ$_{3}$が－Ａ$_{3}$－であり、この際、Ａ$_{3}$は

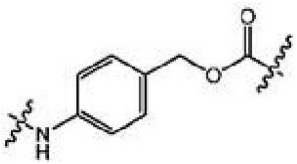
【化２２５】



であり、

Ｌ$_{4}$が

【化２２６】



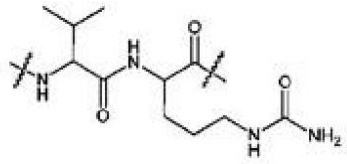
である、［２１］または［２２］の免疫コンジュゲート。

［２７］

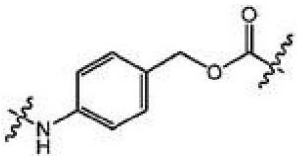
Ｌ$_{1}$が－Ａ$_{1}$Ｘ^{2}－であり、この際、Ａ$_{1}$は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｓ－であり、Ｘ^{2}は－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、

Ｌ$_{2}$が結合－であり、Ｌ$_{3}$が－Ａ$_{3}$－であり、この際、Ａ$_{3}$は－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｃ（＝Ｏ

）－であり、L_4が結合である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［２８］
L_1が－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－ＣＨR^4（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、R^4は－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨであり、
L_2が結合であり、L_3が－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、L_4が結合である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［２９］
L_1が－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、
L_2が結合であり、L_3が結合であり、L_4が－A_4－であり、この際、A_4は－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［３０］
L_1が－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、
L_2が結合であり、L_3が結合であり、L_4が－A_4－であり、この際、A_4は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［３１］
L_1が－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、
L_2が－A_2－であり、この際、A_2は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏであり、
L_3が－A_3－であり、この際、A_3は、
【化２２７】



であり、
L_4が、
【化２２８】



である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［３２］
L_1が－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－（CH_2）Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、
L_2が結合－であり、L_3が－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、L_4が結合である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［３３］
L_1が－A_1X^2－であり、この際、A_1は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－であり、X^2は－ＣＨR^4（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－であり、R^4は－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨであり、
L_2が結合であり、L_3が－A_3－であり、この際、A_3は－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－であり、L_4が結合である、［２１］または［２２］に記載の免疫コンジュゲート。
［３４］
末端基が、抗炎症薬、抗癌薬、抗真菌薬、抗菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、および

麻酔薬から選択される部分である、［１９］から［３３］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［３５］

末端基が、Ｖ－ＡＴＰアーゼ阻害薬、ＨＳＰ９０阻害薬、ＩＡＰ阻害薬、ｍＴｏｒ阻害薬、微小管安定薬、微小管不安定化薬、オーリスタチン、ドラスタチン、マイタンシノイド、ＭｅｔＡＰ（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質ＣＲＭ１の核外輸送の阻害薬、ＤＰＰＩＶ阻害薬、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害薬、タンパク質合成阻害薬、ＣＤＫ２阻害薬、ＣＤＫ９阻害薬、Ｅｇ５阻害薬、ＨＤＡＣ阻害薬、ＤＮＡ損傷薬、ＤＮＡアルキル化薬、ＤＮＡインターカレーター、ＤＮＡ小溝結合薬、プロテアソーム阻害薬、ＲＮＡポリメラーゼ阻害薬、およびＤＨＦＲ阻害薬から選択される、［３４］に記載の免疫コンジュゲート。

［３６］

末端基が、フルオロフォア、クロモフォア、量子ドット、磁性プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、または造影試薬から選択される、［１９］から［３３］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［３７］

アフィニティープローブがビオチンである、［１９］から［３３］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［３８］

前記修飾抗体またはその断片が１つまたは複数の直交性コンジュゲーション部位をさらに含む、［１９］から［３７］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［３９］

各直交性コンジュゲーション部位が、独立に、Ｓｆｐ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質、ＡｃｐＳ４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの基質、リシン、システイン、チロシン、ヒスチジン、ホルミルグリシン、非天然アミノ酸、ピロリシン、およびピロリン－カルボキシリシンから選択される、［３８］に記載の免疫コンジュゲート。

［４０］

有効量の［１９］から［３９］のいずれかに記載の免疫コンジュゲートまたは薬学的に許容されるその塩と、薬学的に許容される賦形剤、担体、または添加剤とを含む医薬組成物。

［４１］

医薬として使用するための、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体もしくはその断片、または［１９］から［３９］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［４２］

癌、炎症性疾患、または感染症を治療する際に使用するための、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体もしくはその断片、または［１９］から［３９］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［４３］

癌を治療する際に使用するための、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体もしくはその断片、または［１９］から［３９］のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

［４４］

癌を治療する方法であって、それを必要とする哺乳動物に、有効量の［１９］から［３９］のいずれかに記載の免疫コンジュゲートまたは［４０］に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

［４５］

前記哺乳動物がヒトである、［４４］に記載の方法。

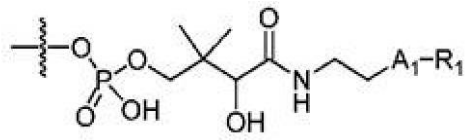
［４６］

［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体またはその断片をコードする核酸。

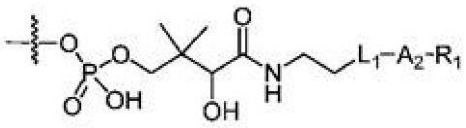
［４７］

［４６］に記載の核酸を含む宿主細胞。
［４８］
抗癌薬とさらにコンジュゲートしている、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体またはその抗体断片。
［４９］
［１９］から［３９］に記載の免疫コンジュゲートを生成する方法であって、適切な条件下で、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体または抗体断片、４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ、およびＣｏＡに連結している末端基またはＣｏＡ類似体に連結している末端基をインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片および末端基を含む免疫コンジュゲートの形成を促進することを含む方法。
［５０］
［１９］から［３９］に記載の免疫コンジュゲートを生成する方法であって、
ｉ）適切な条件下で、［１］から［１８］のいずれかに記載の抗体または抗体断片を４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたはＣｏＡ類似体と共にインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を抗体または抗体断片に結合させるステップであって、４’－ホスホパンテテインおよび４’－ホスホパンテテイン類似体が官能基を含むステップと、
ｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を、末端基に連結していてもよい反応性基と反応させ、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片および末端基を含む免疫コンジュゲートを形成するステップと
を含む方法。
［５１］
［１９］から［３９］に記載の免疫コンジュゲートを生成する方法であって
ｉ）適切な条件下で、［１］から［１８］のいずれかに記載の抗体または抗体断片を４’－ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼおよびＣｏＡまたはＣｏＡ類似体と共にインキュベートし、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を抗体または抗体断片に結合させるステップであって、４’－ホスホパンテテインおよび４’－ホスホパンテテイン類似体が保護官能基を含むステップと、
ｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体の保護官能基を脱保護するステップと、
ｉｉｉ）４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体の脱保護官能基を、末端基に連結していてもよい反応性基と反応させ、それによって、４’－ホスホパンテテインまたは４’－ホスホパンテテイン類似体を含むリンカーによって一緒に連結している抗体または抗体断片および末端基を含む免疫コンジュゲートを形成するステップと
を含む方法。
［５２］
前記適切な条件が、４℃～３７℃の温度およびｐＨ６．５～ｐＨ９．０を含む、［４９］から［５１］のいずれかに記載の方法。
［５３］
前記修飾抗体または抗体断片中のペプチドタグのセリン残基が、式（Ｄ－ａ）、式（Ｅ－ａ）、式（Ｆ－ａ）、または式（Ｇ－ａ）の構造を有する４’－ホスホパンテテイン基：

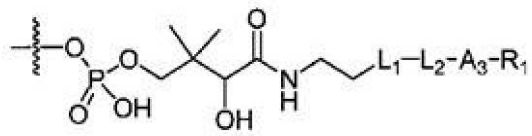
【化２２９】



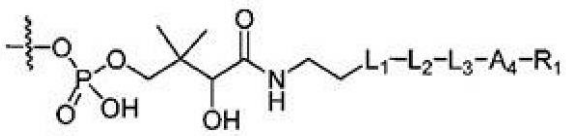
式（Ｄ－ａ）



式（Ｅ－ａ）



式（Ｆ－ａ）



式（Ｇ－ａ）

［式中、

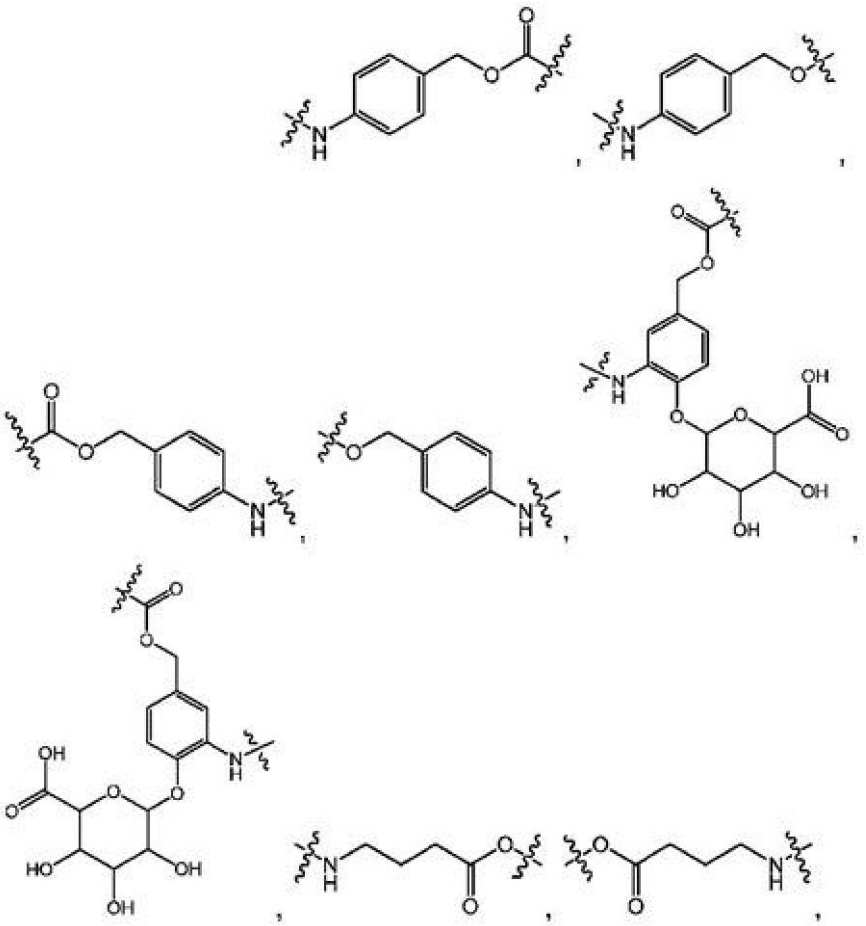
Ｌ$_1$は、－Ａ$_1$Ｘ^2－または－Ｘ^2－であり、

Ｌ$_2$は、結合、－Ａ$_2$－、または－Ａ$_2$Ｘ^2－であり、

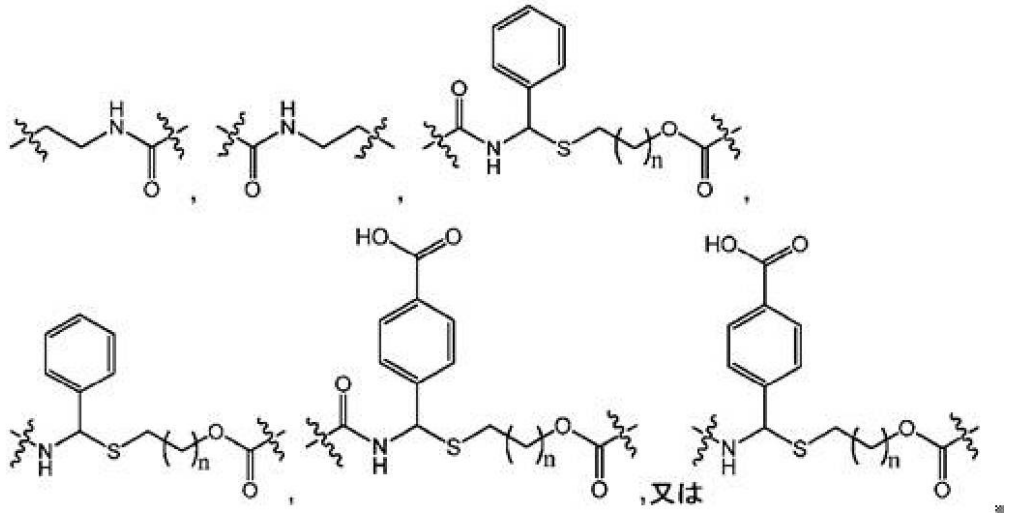
Ｌ$_3$は、結合、－Ａ$_3$－、または－Ａ$_3$Ｘ^2－であり、

Ｌ$_4$は、結合－Ａ$_4$－、－Ａ$_4$Ｘ^2－、

【化２３０－１】



【化２３０－２】



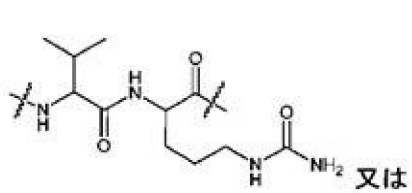
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、または－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$－、－（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$－、－（（CH_2）$_n$Ｏ）$_m$（CH_2）$_n$－、－（（（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｏ）$_m$Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^4－、－（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－（CH_2）$_n$Ｓ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｓ－、－Ｓ（CH_2）$_n$－、－Ｓ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$ＮＨ－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$Ｃ（＝Ｏ）－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$（Ｏ（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$）$_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）（Ｃ（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH_2）$_n$（Ｏ（CH_2）$_n$）$_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（CH_2）$_n$－、－（Ｃ（

$R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、

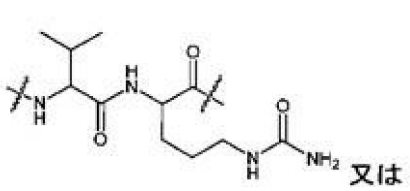
【化２３１】



であり、

A_3は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nS-$、$-(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_n-$、$-S(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mC(=O)-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、

【化２３２】



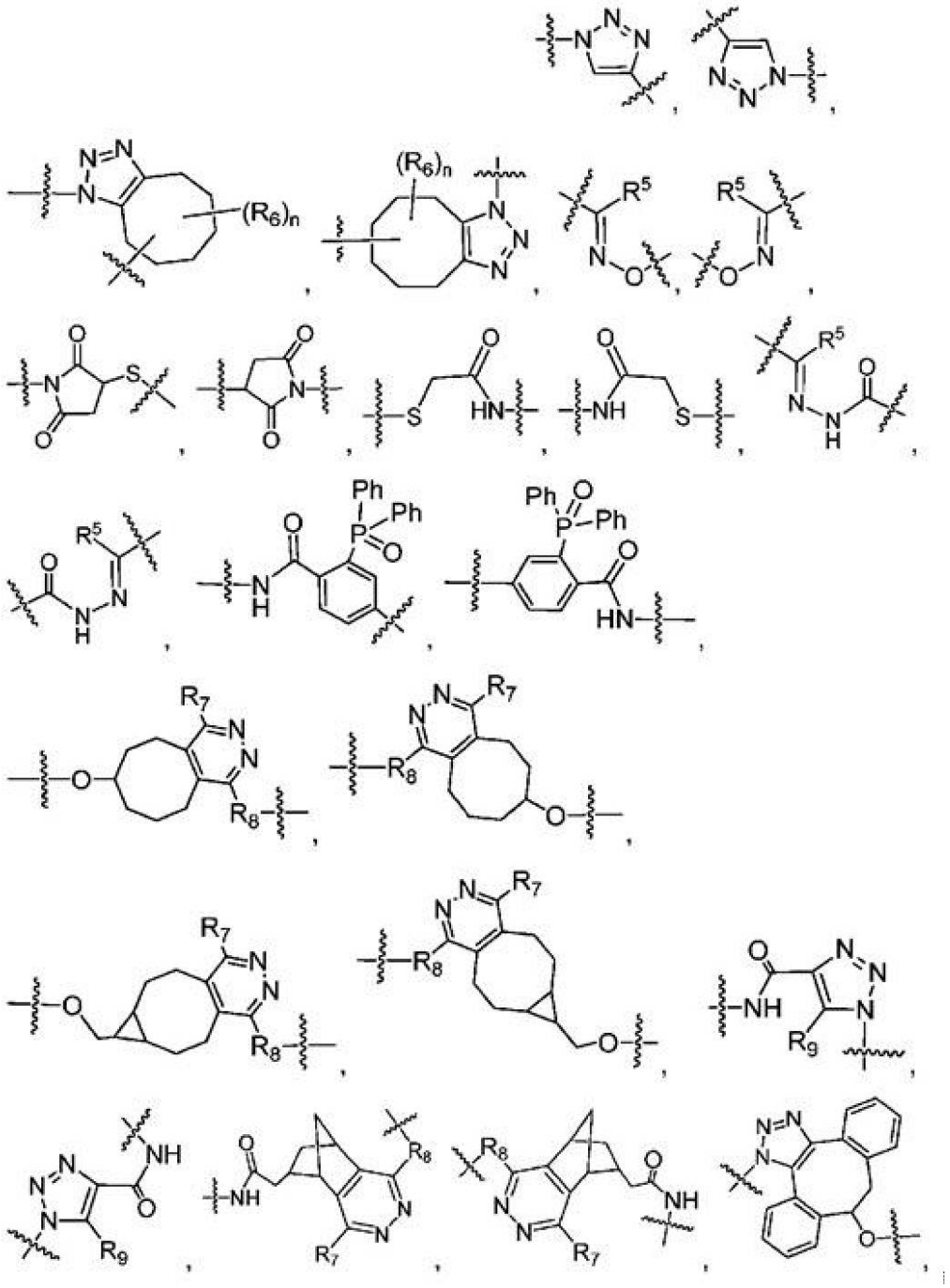
であり、

A_4は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)$

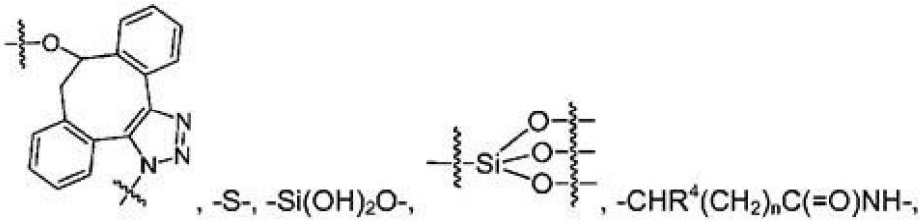
$_2)_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$NH（（CH$_2$）$_n$O）$_m$（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^{2}は、独立に、結合、

【化２３３】



【化２３４】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

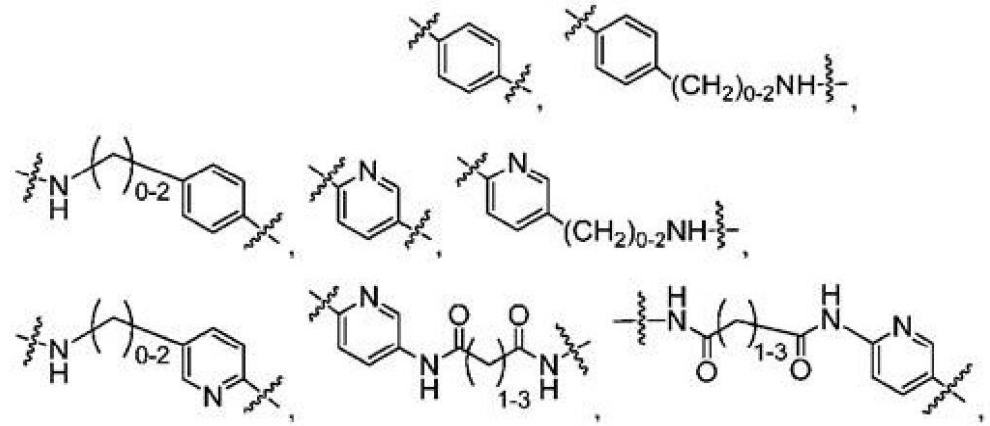
各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【化２３５】



から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1}$～$_{6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

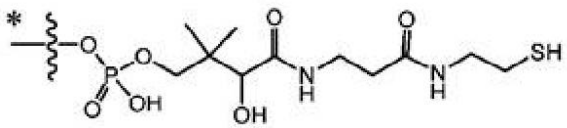
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

Ｒ^{1}は、チオール、マレイミド、ハロアセトアミド、アルキン、トリアリールホスフィン、シクロオクテン、オキサノボルナジエン、アジド、ジアリールテトラジン、ノルボルネン、モノアリールテトラジン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、ＮＨ$_{2}$－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、アルデヒド、またはケトンである］とコンジュゲートしている、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体または抗体断片を含む免疫コンジュゲート。

［５４］

４’－ホスホパンテテイン基が、

【化２３６】

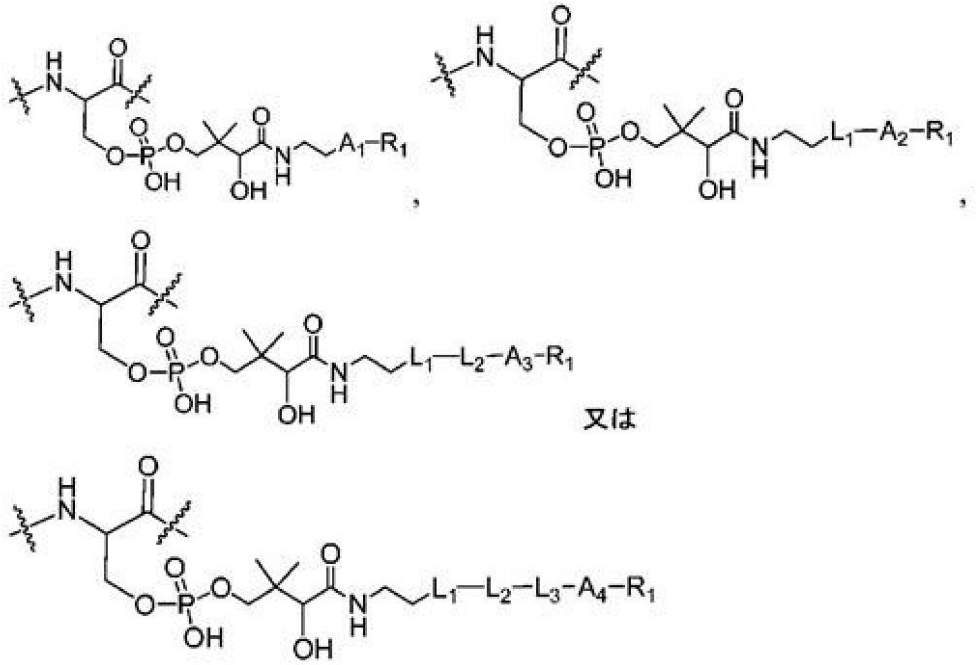


である、［５３］に記載の免疫コンジュゲート。

［５５］

コンジュゲートセリンが、

【化２３７】



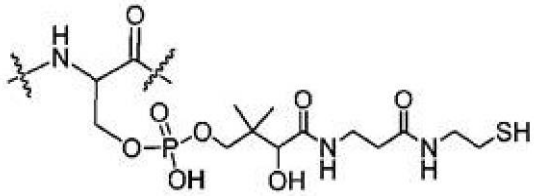
又は

から選択される構造を有する、［５３］に記載の免疫コンジュゲート。

［５６］

コンジュゲートセリンが、

【化２３８】

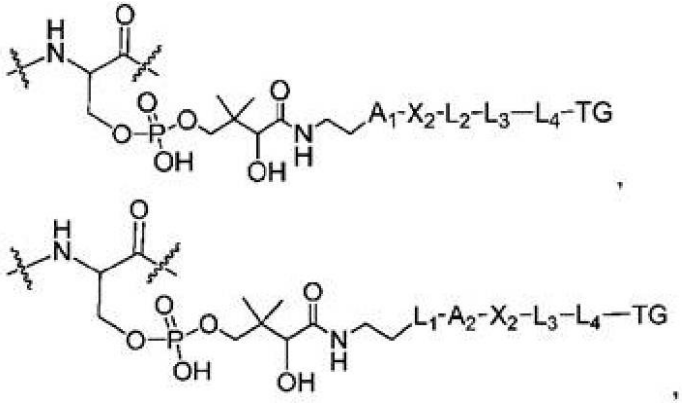


である、［５５］に記載の免疫コンジュゲート。

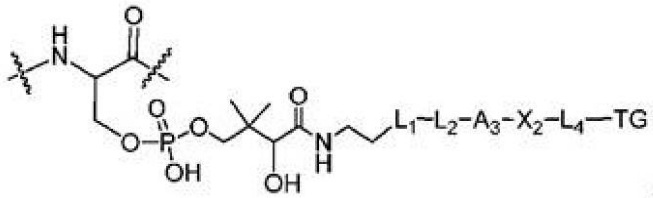
［５７］

前記修飾抗体または抗体断片中のペプチドタグのセリン残基が、修飾４’－ホスホパンテテイン基とコンジュゲートしており、

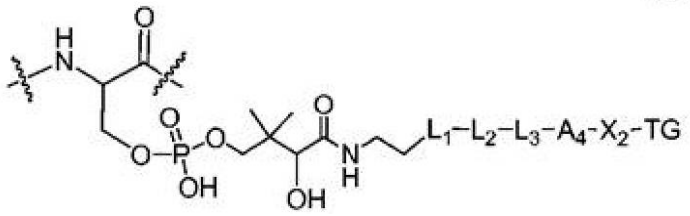
【化２３９－１】



【化２３９－２】



，及び



［式中、

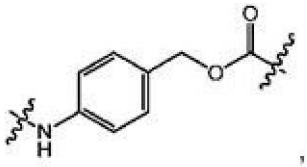
L_1は、－A_1X^2－または－X^2－であり、

L_2は、結合、－A_2－、または－A_2X^2－であり、

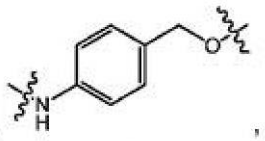
L_3は、結合、－A_3－、または－A_3X^2－であり、

L_4は、結合－A_4－、－A_4X^2－、

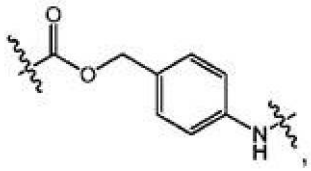
【化２４０－１】



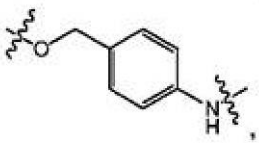
，



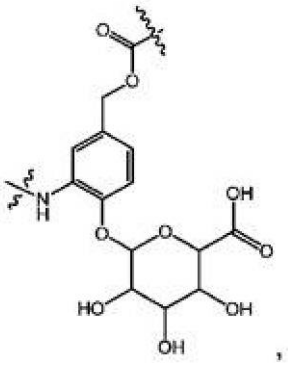
，



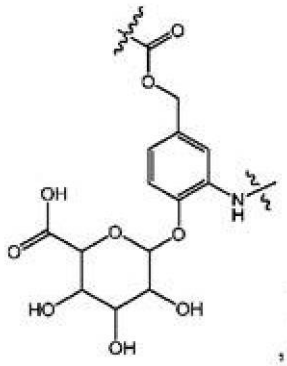
，



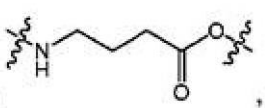
，



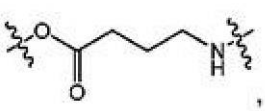
，



，

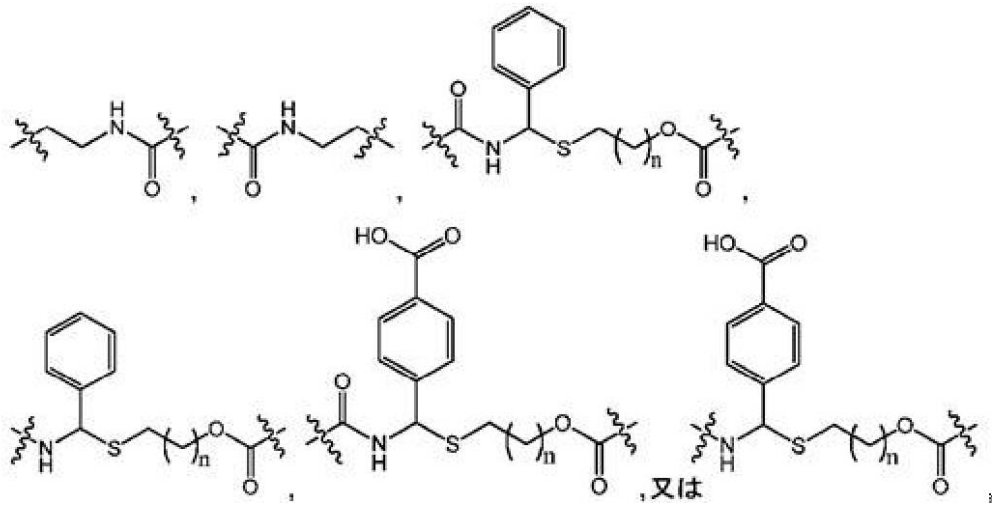


，



，

【化２４０－２】



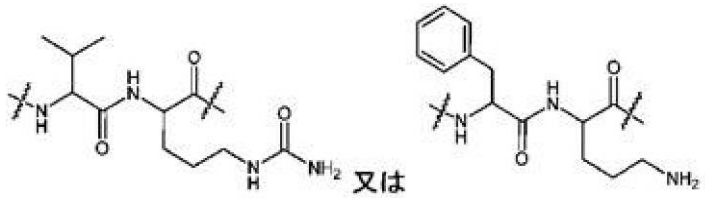
であり、

A_1は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$(O(C(R^4)_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nS$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nS$－、－Ｓ$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_n$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨ$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_n$ＮＨ$((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、または－$(O(C(R^4)_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－であり、

A_2は、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_n$－、－$(O(CH_2)_n)_m$－、－$(O(C(R^4)_2)_n)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_m$－、－$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$－、－$((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＲ^4－、－$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nS$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nS$－、－Ｓ$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｓ$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）ＮＨ－、－$(CH_2)_nS$－、－$(C(R^4)_2)_nS$－、－Ｓ$(CH_2)_n$－、－Ｓ$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_n$ＮＨ－、－$(C(R^4)_2)_n$ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_nNHC$（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－Ｃ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(C(R^4)_2)_nC$（＝Ｏ）－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$ＮＨＣ（＝Ｏ）$(C(R^4)_2)_n$－、－$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ$(CH_2)_n$－、－$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ$(C(R^4)_2)_n$－、－（

$CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、

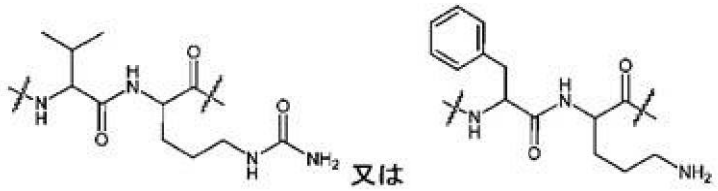
【化２４１】



であり、

A_3は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nS-$、$-(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_n-$、$-S(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)(CH_2)_n-$、$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)-$、$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mC(=O)-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、

【化２４２】



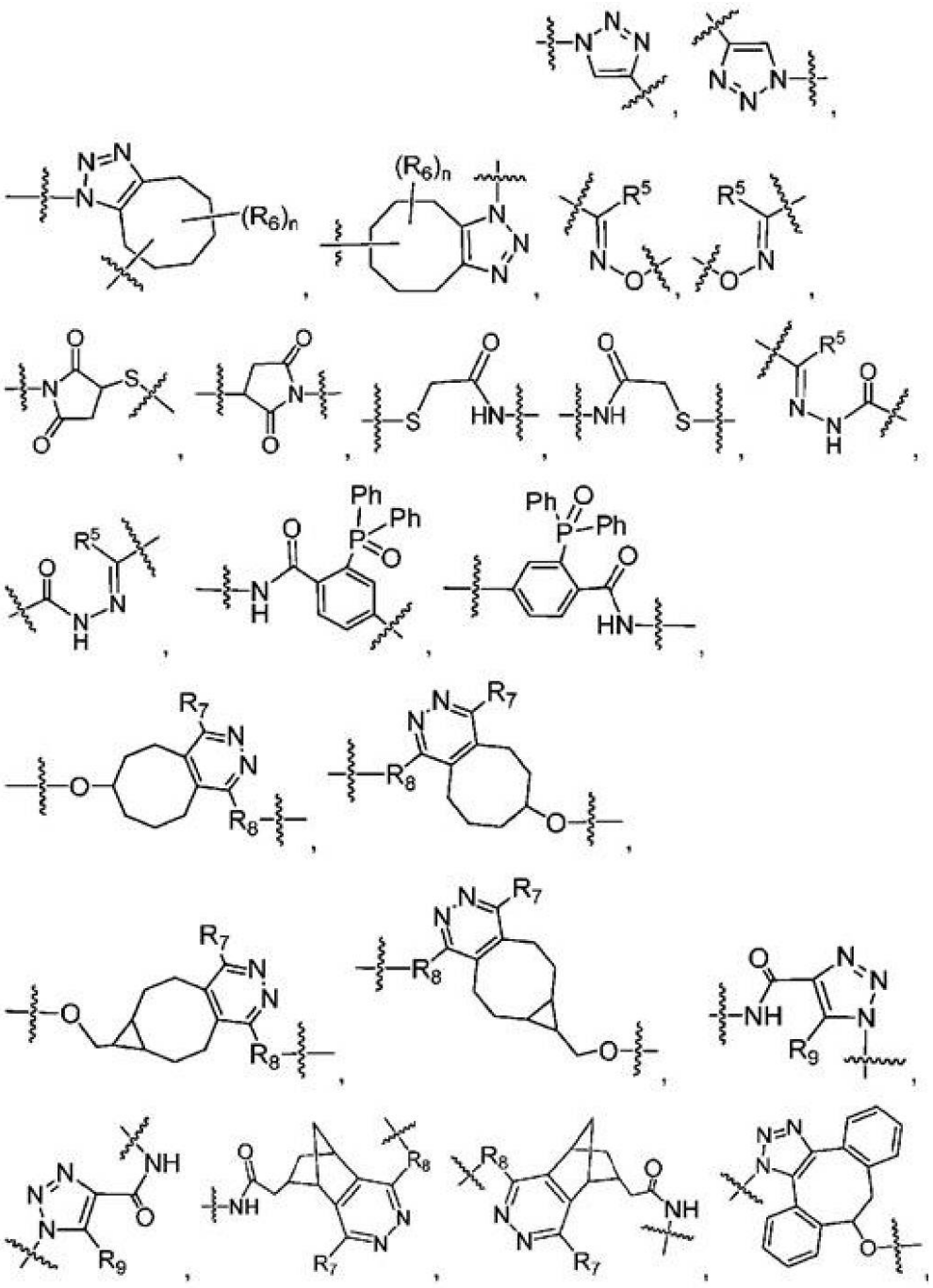
であり、

A_4は、$-C(=O)NH-$、$-C(=O)NH(CH_2)_n-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$、$-(O(CH_2)_n)_m-$、$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$、$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$、$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$、$-(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$、$-(CH_2)_nNHC(=O)-$、$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$、$-NHC(=O)(CH_2)_n-$、$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$、$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$、$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$、$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$、$-S(C(R^4)$

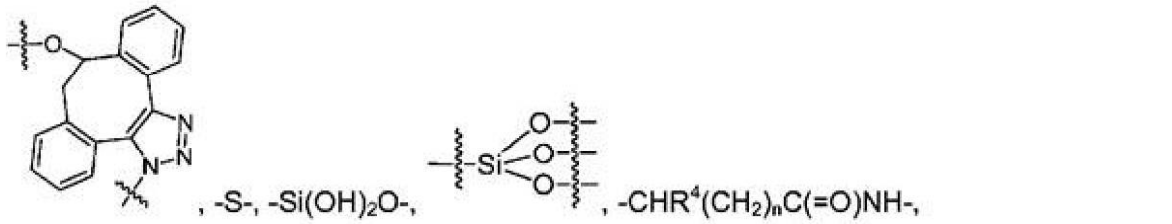
$_2)_n$C（＝O）NH－、－C（＝O）NH（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）NH（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－C（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－C（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$C（＝O）－、－（C（R^4）$_2$）$_n$C（＝O）－、－（CH$_2$）$_n$（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（CH$_2$）$_n$NH（（CH$_2$）$_n$O）$_m$（CH$_2$）$_n$－、－（C（R^4）$_2$）$_n$NH（（C（R^4）$_2$）$_n$O）$_m$（C（R^4）$_2$）$_n$－、－（O（CH$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（CH$_2$）$_n$－、または－（O（C（R^4）$_2$）$_n$）$_m$NHC（＝O）（C（R^4）$_2$）$_n$－であり、

各X^{2}は、独立に、結合、

【化２４３】



【化２４４】



、－ＣＨＲ^{4}（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、および－ＮＨＣ（＝Ｏ）－から選択され、

各Ｒ^{4}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、および－ＯＨから選択され、

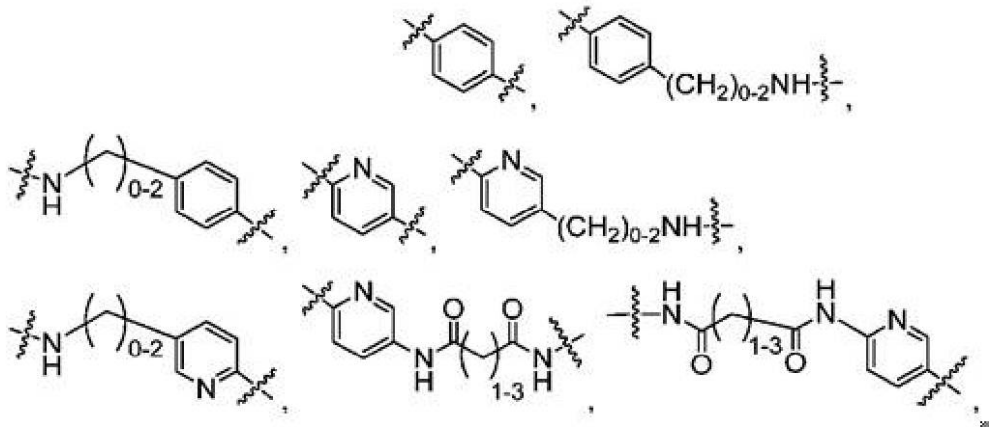
各Ｒ^{5}は、独立に、Ｈ、Ｃ$_{1}$～$_{4}$アルキル、フェニル、または１～３個の－ＯＨ基で置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

各Ｒ^{6}は、独立に、Ｈ、フルオロ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジルオキシ、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているベンジル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルコキシ、および－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨで置換されているＣ$_{1}$～$_{4}$アルキルから選択され、

Ｒ^{7}は、独立に、Ｈ、フェニル、およびピリジンから選択され、

Ｒ^{8}は、独立に、

【化２４５】



から選択され、

Ｒ^{9}は、独立に、ＨおよびＣ$_{1}$～$_{6}$ハロアルキルから選択され、

各ｎは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

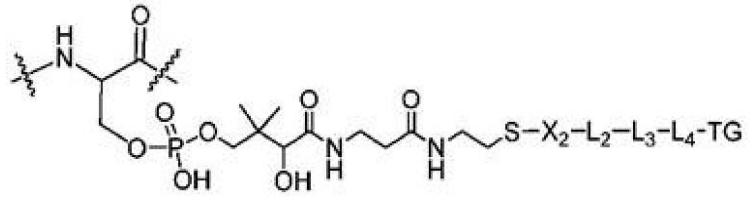
各ｍは、独立に、１、２、３、４、５、６、７、８、および９から選択され、

ＴＧは、薬物部分、アフィニティープローブ、キレーター、分光学的プローブ、放射性プローブ、イメージング試薬、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、多糖、アセチル基、または表面である］から選択される構造を有する、［１］から［１８］のいずれかに記載の修飾抗体または抗体断片を含む免疫コンジュゲート。

［５８］

コンジュゲートセリンが、

【化２４６】

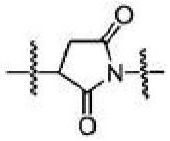


である、［５７］に記載の免疫コンジュゲート。

［５９］

X_2が、

【化２４７】



または－（CH_2）C（＝O）NH－である、［５８］に記載の免疫コンジュゲート。

【図１】

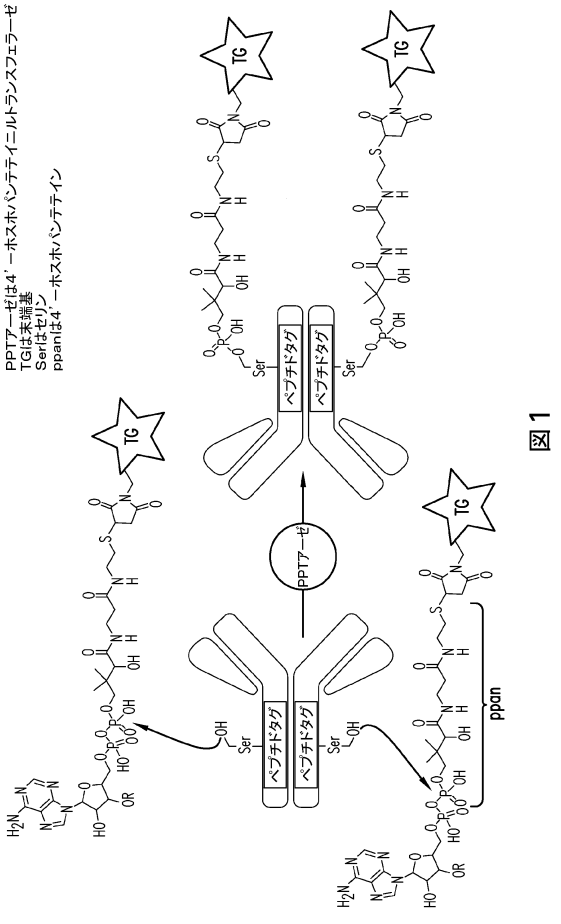


図１

【図２－１】

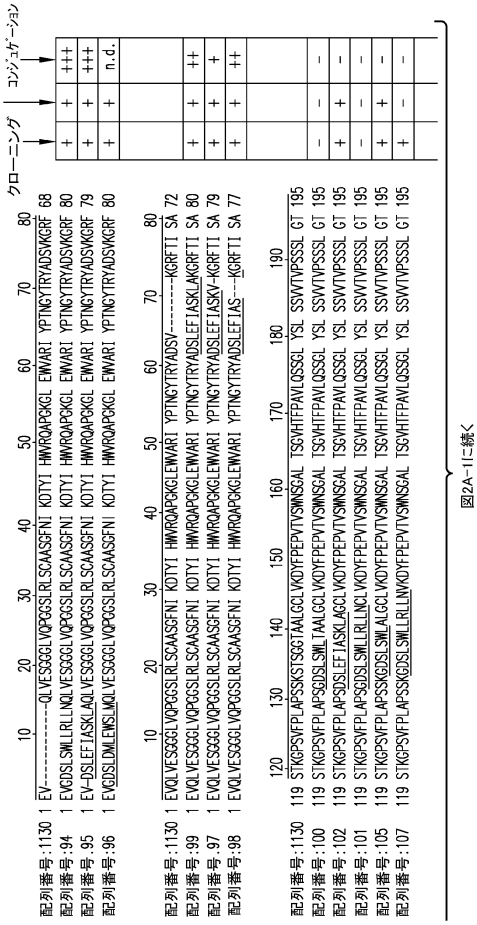


図 2A

【図２－２】

図2Aからの続き

| | | |

【図４－１】

```
トラスツズマブ, Igγ1鎖C領域                  119 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT 197
P01857[1-330], Igγ1鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  119 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT 197
P01859[1-326], Igγ2鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  119 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT 197
P01860[1-377], Igγ3鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  119 STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT 197
P01861[1-327], Igγ4鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  119 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT 197

トラスツズマブ, Igγ1鎖C領域                  198 YICNVNHKPSNTKVDKKVE----------PKSCDKTHTCPPCP 230
P01857[1-330], Igγ1鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  198 YICNVNHKPSNTKVDKKVE----------PKSCDKTHTCPPCP 230
P01859[1-326], Igγ2鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  198 YTCNVDHKPSNTKVDKTVER----------KCCVECPPCP 227
P01860[1-377], Igγ3鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  198 YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP 277
P01861[1-327], Igγ4鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  198 YTCNVDHKPSNTKVDKRVES----------KYGPPCPSCP 227

トラスツズマブ, Igγ1鎖C領域                  231 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH 310
P01857[1-330], Igγ1鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  231 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH 310
P01859[1-326], Igγ2鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  228 APPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH 306
P01860[1-377], Igγ3鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  278 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH 357
P01861[1-327], Igγ4鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  228 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH 307
```

図4A−1に続く

図4A

【図４－２】

図4Aからの続き

```
トラスツズマブ, Igγ1鎖C領域                  311 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN 390
P01857[1-330], Igγ1鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  311 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEETTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN 390
P01859[1-326], Igγ2鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  307 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENN 386
P01860[1-377], Igγ3鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  358 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENN 437
P01861[1-327], Igγ4鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  308 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN 387

トラスツズマブ, Igγ1鎖C領域                  391 YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446
P01857[1-330], Igγ1鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  391 YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446
P01859[1-326], Igγ2鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  387 YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 442
P01860[1-377], Igγ3鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  438 YNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG 493
P01861[1-327], Igγ4鎖C領域, ヒト( Homo sapiens )  388 YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG 443
```

図 4A-1

【図２－６】

図2B−1からの続き

```
                                10        20        30        40        50        60        70        80
配列番号:1131          1 DI----------QMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSG 68
配列番号:26            1 DIGDSLSWLLRLLNQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSG 80   +  −  −
配列番号:27            1 DI-DSLEFIASKLAQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSG 79   +  +  ++

                        80        90       100       110       120       130       140       150       160
配列番号:1131 76 SSL--------QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN 152
配列番号:30   76 DSLEFIASKLAQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN 160   +  +  −

                       150       160       170       180       190       200       210       220
配列番号:1131        150 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC---------- 214
配列番号:29          150 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-DSLEFIASKLA 225   +  +  −
配列番号:28          150 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGDSLSWLLRLLN 226   +  +  −
```

図 2B-2

【図３】

```
119  STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS                177
178  GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX'1VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG             237
238  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN               297
298  STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX'2E             357
358  X'3TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW             417
418  QQGNV FSCSVMHEX'4LHNHYTQKSLSLSPG                                           446
```

図 3A

```
109  TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNX'5LQSGNSQESVTEQDS            168
169  KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKX'6YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                           214
```

図 3B

【図４－３】

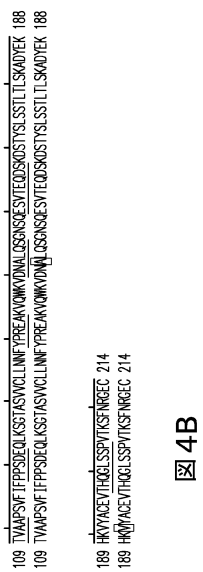


図4B

【図５－Ａ】

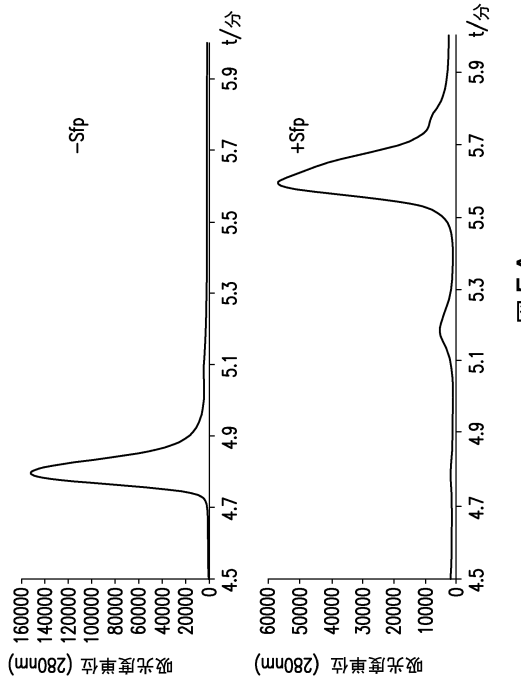


図5A

【図５－Ｂ】

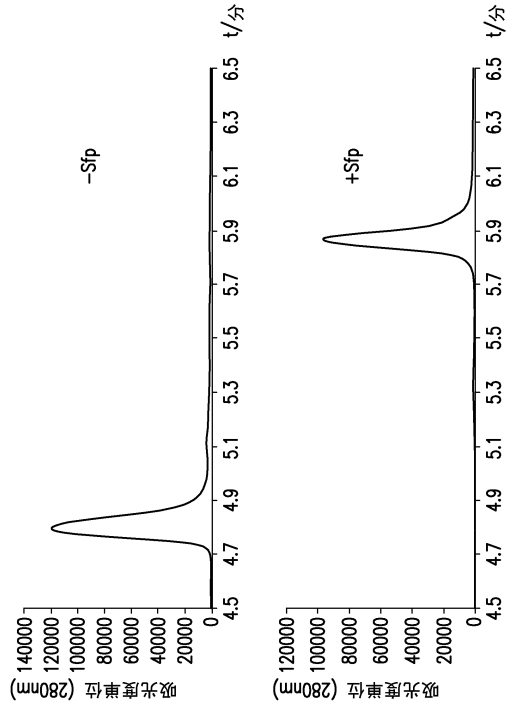


図5B

【図５－Ｃ】

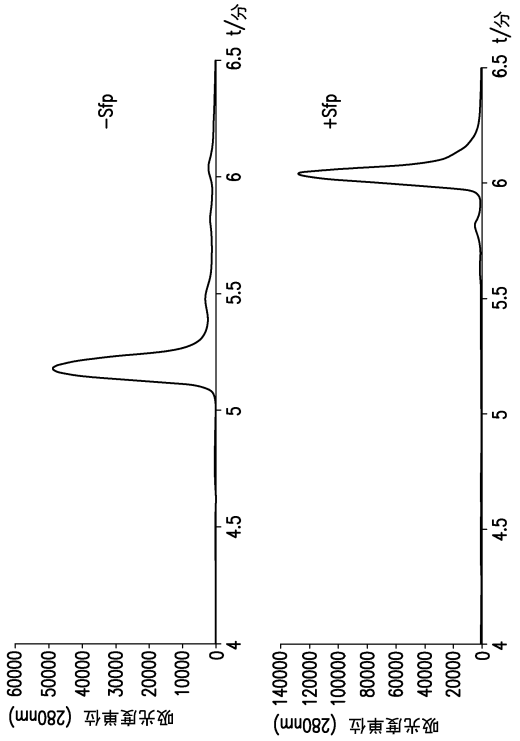


図5C

【図５－Ｄ】

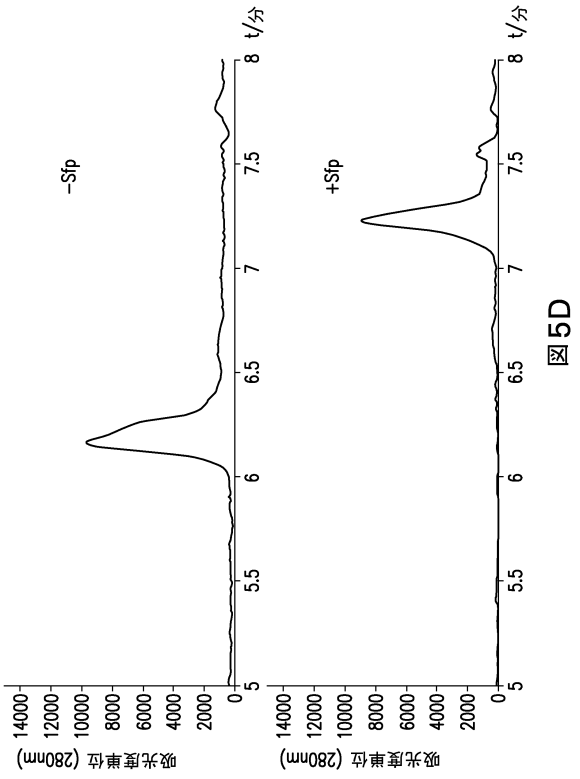


図5D

【図５－Ｅ】

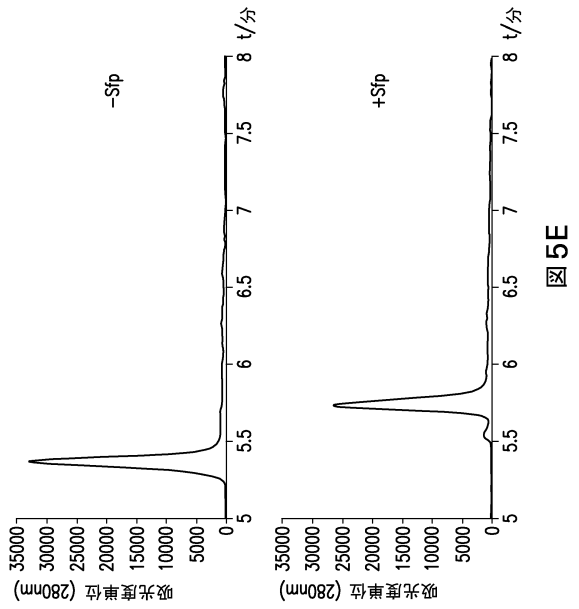


図5E

【図５－Ｆ】

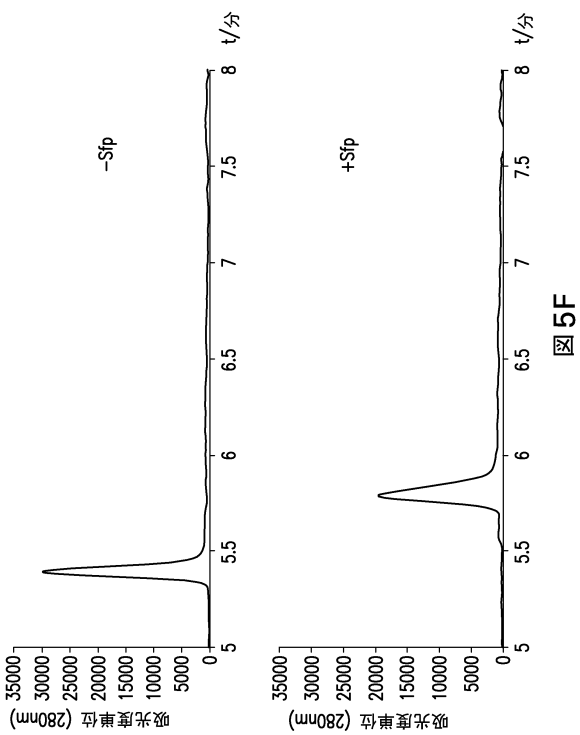


図5F

【図５－Ｇ】

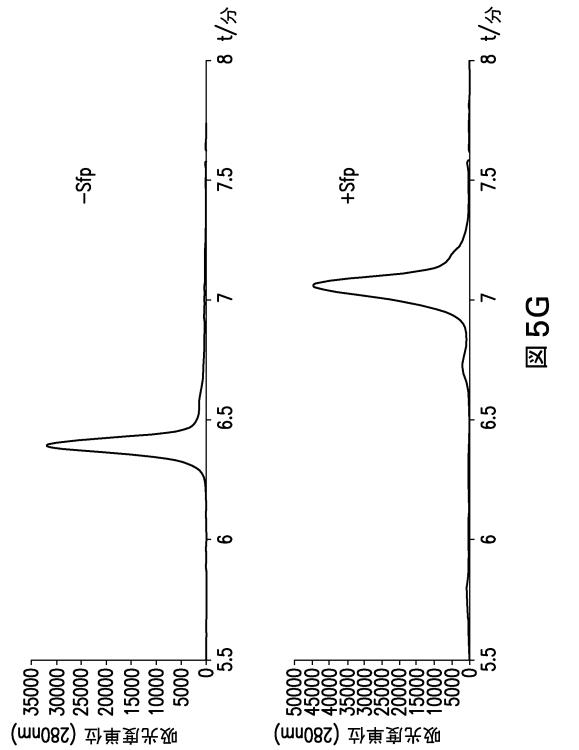


図5G

【図５－Ｈ】

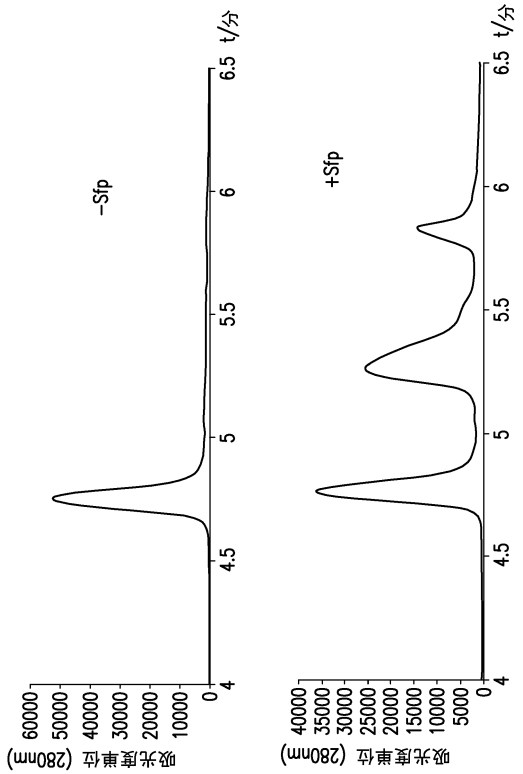


図5H

【図６－１】

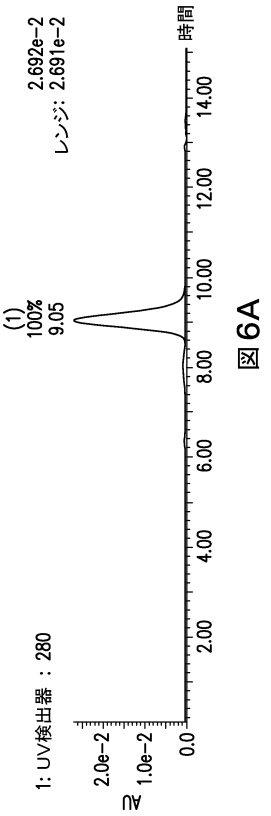


図6A

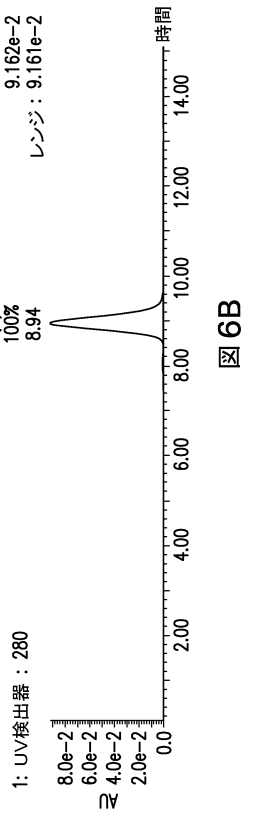


図6B

【図６－２】

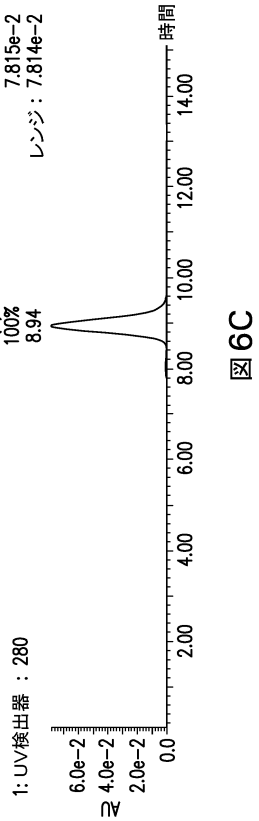


図6C

【図７】

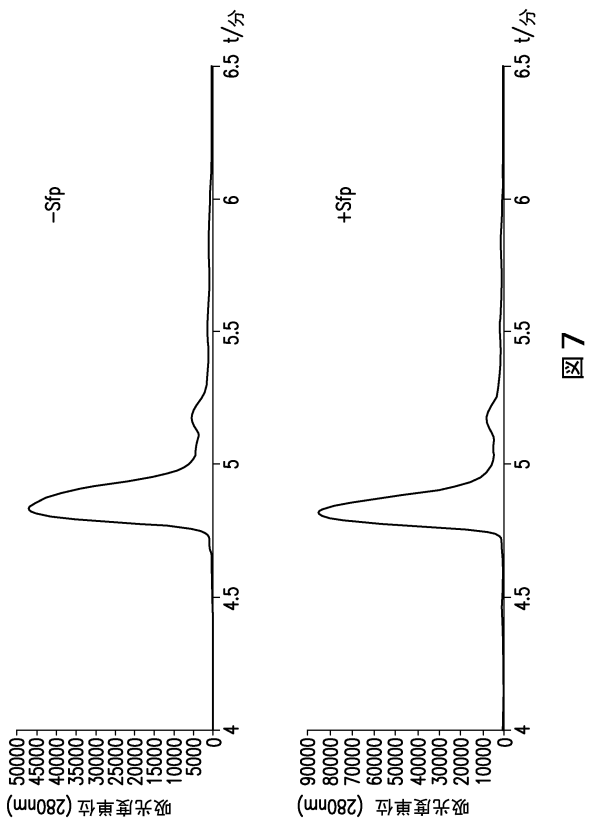


図7

【図８－Ａ】

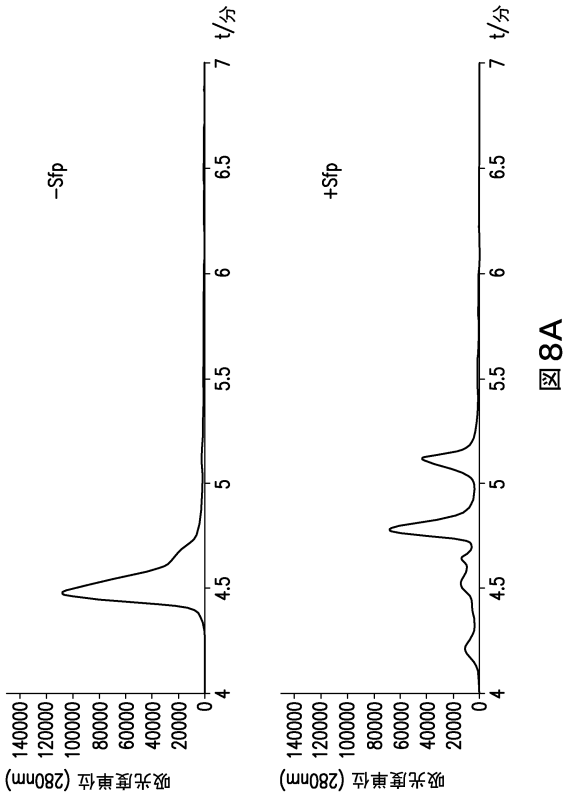


図8A

【図８－Ｂ】

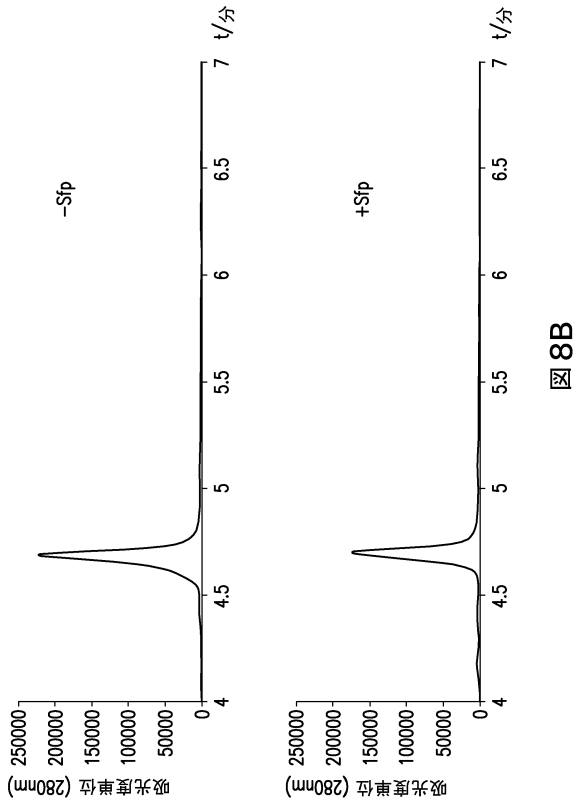


図8B

【図９－Ａ】

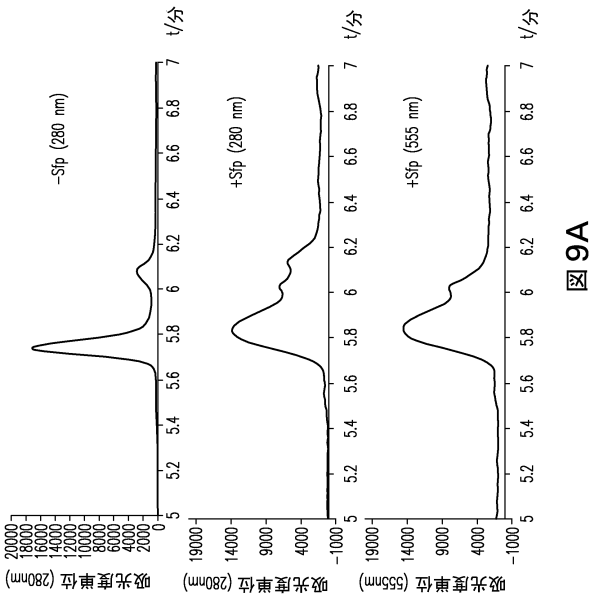


図9A

【図９－Ｂ】

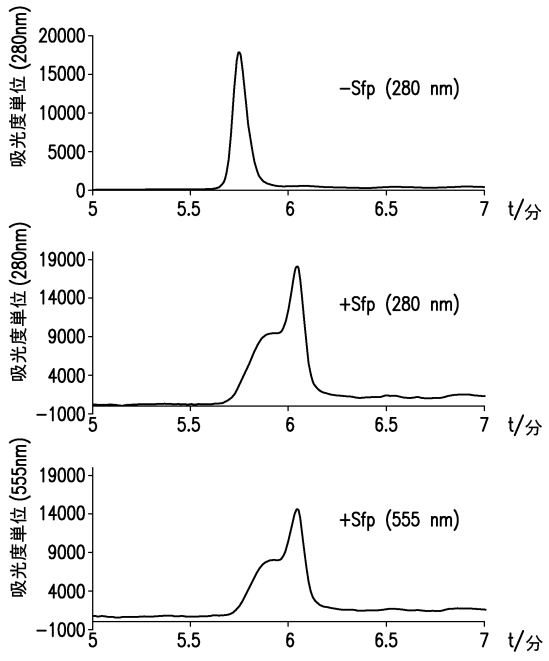


図9B

【図１０－Ａ】

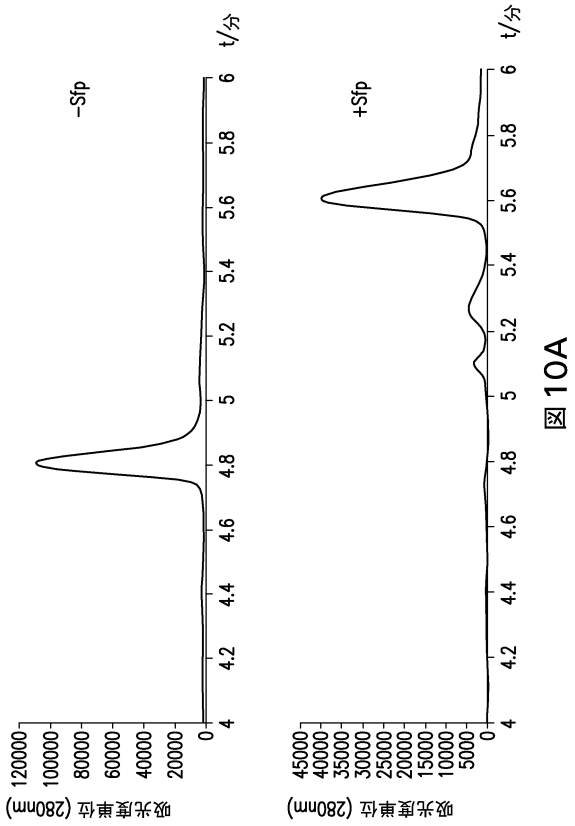


図10A

【図１０－Ｂ】

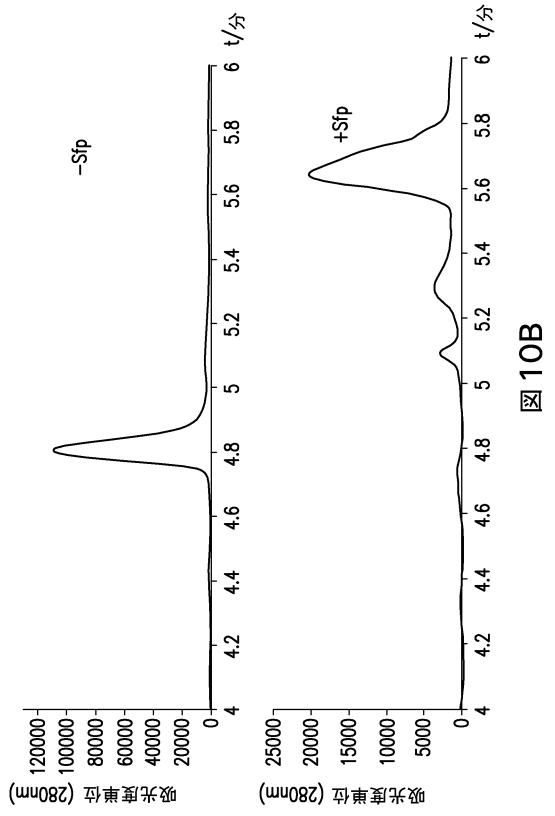


図10B

【図１１－Ａ】

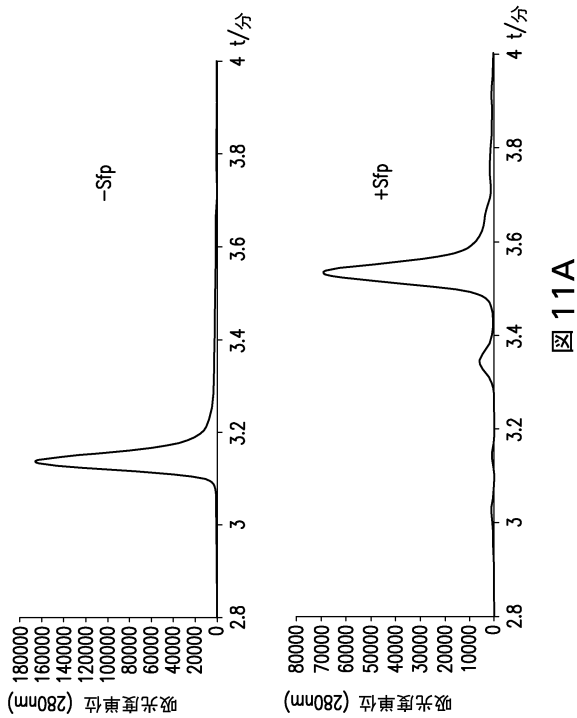


図11A

【図１１－Ｂ】

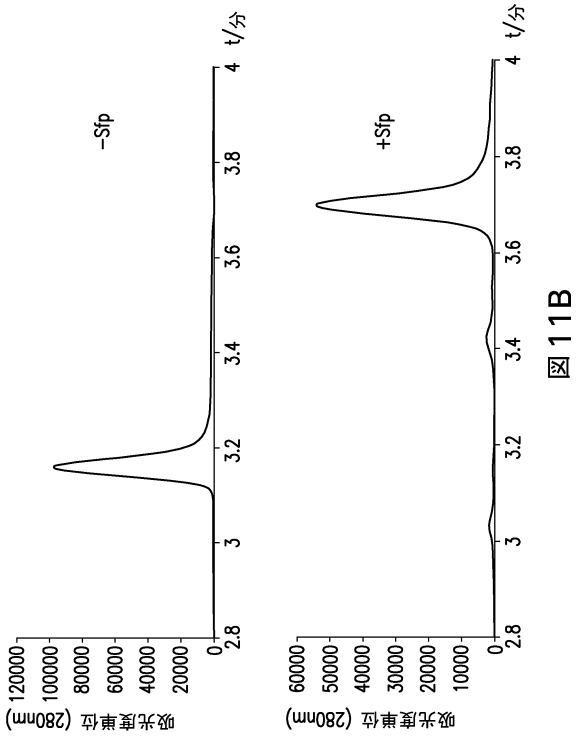


図11B

【図１２】

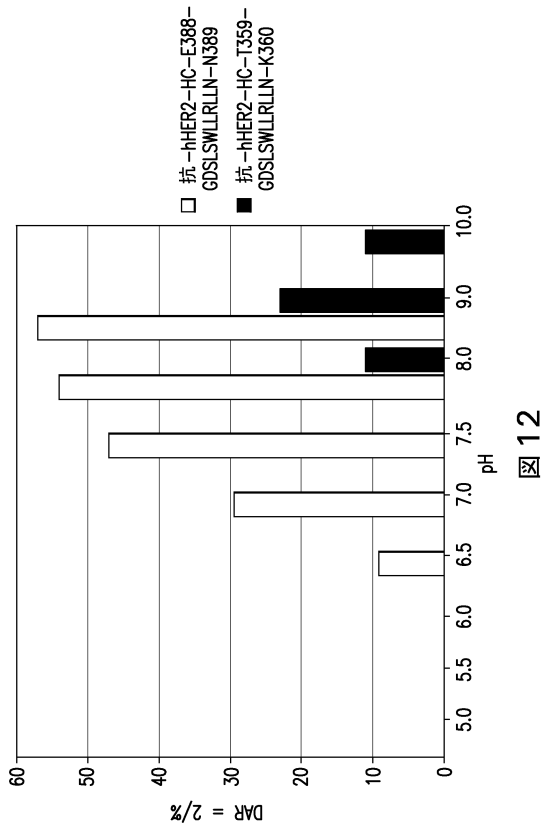


図12

【図１３－Ａ】

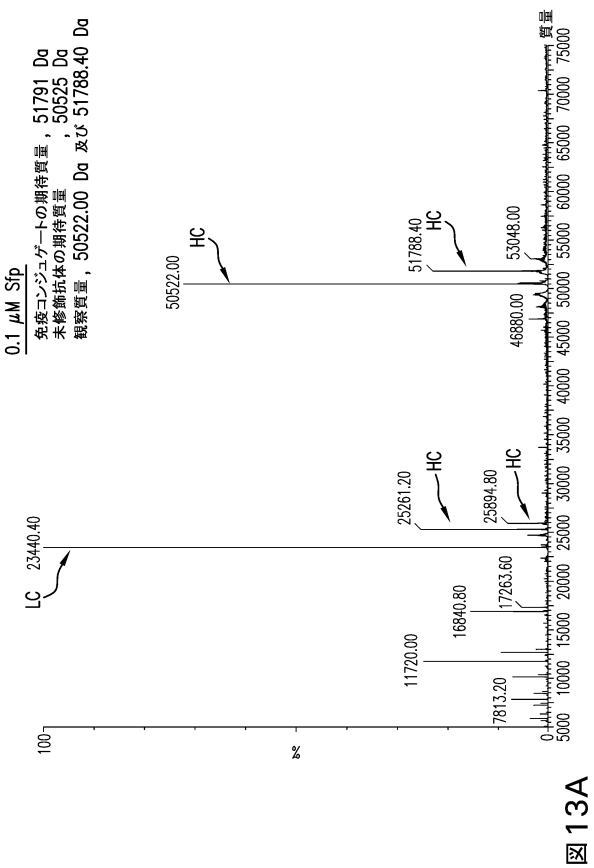


図13A

【図１３－Ｂ】

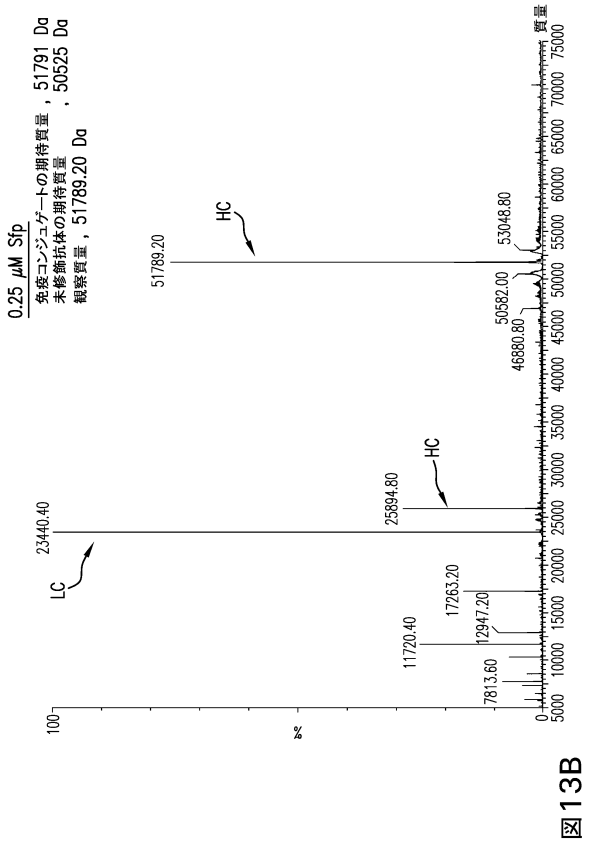


図13B

【図１３－Ｃ】

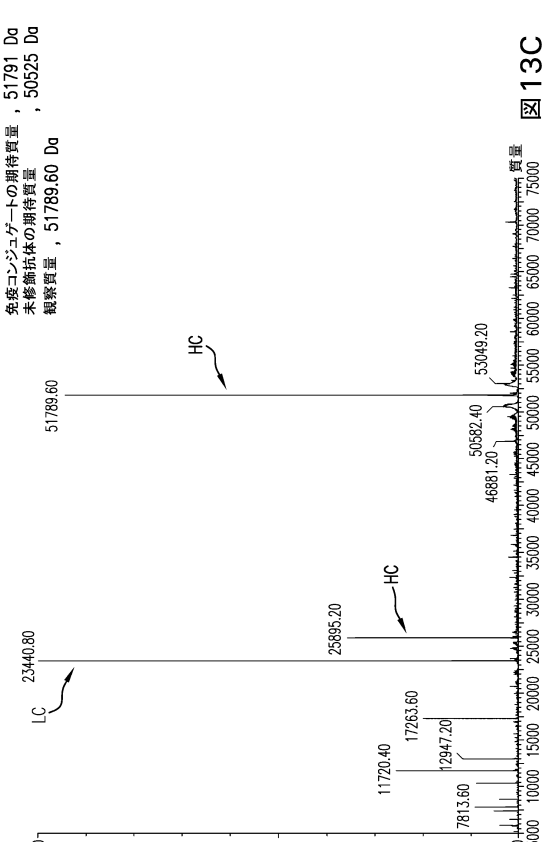


図13C

【図１４－Ａ】

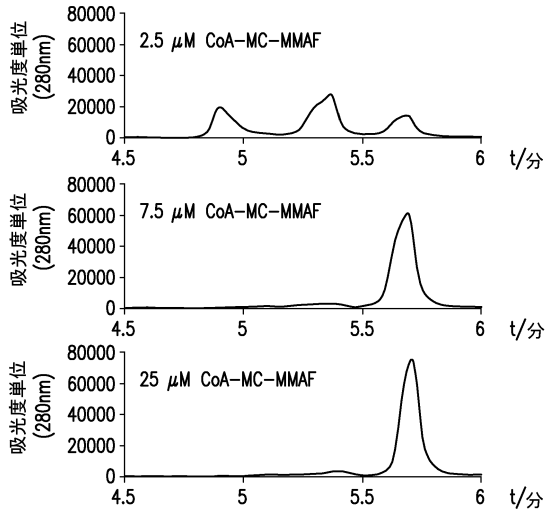


図14A

【図１４－Ｂ】

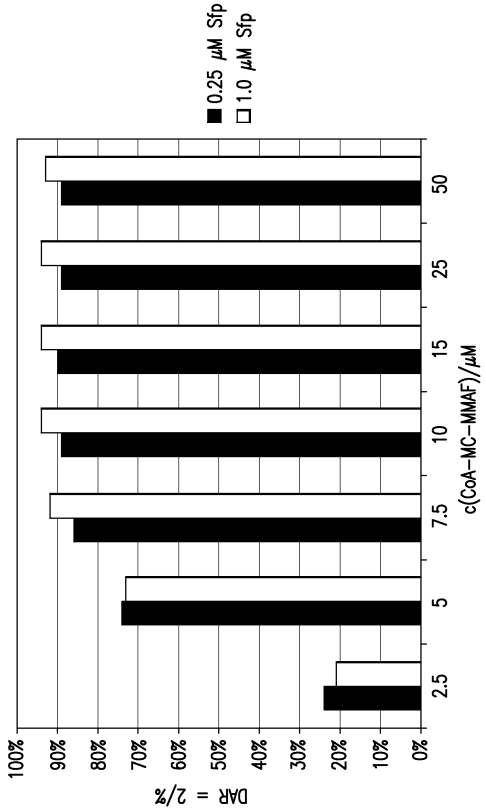


図14B

【図１５】

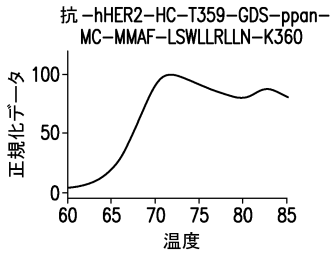


図15A

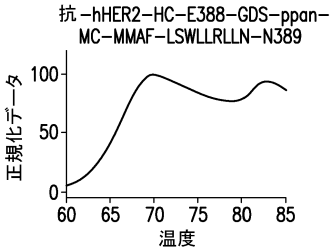


図15B

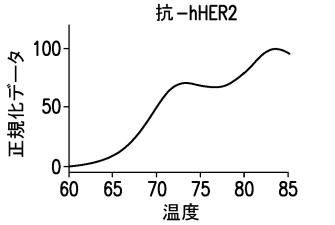


図15C

【図１６】

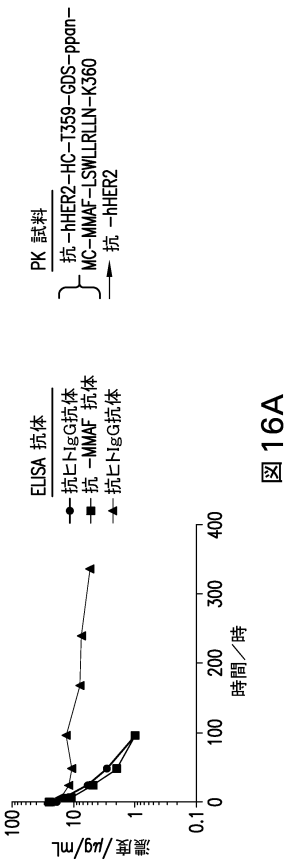


図16A

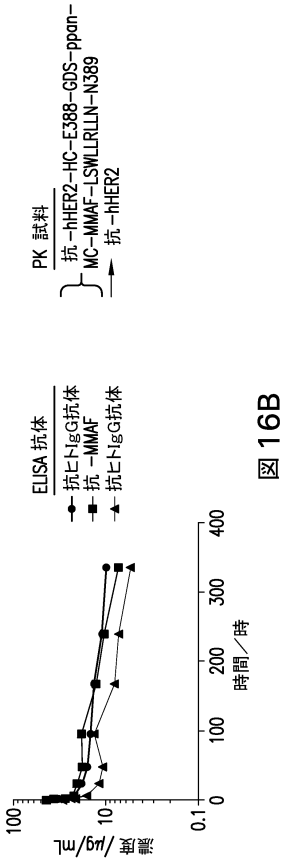


図16B

【図１７】

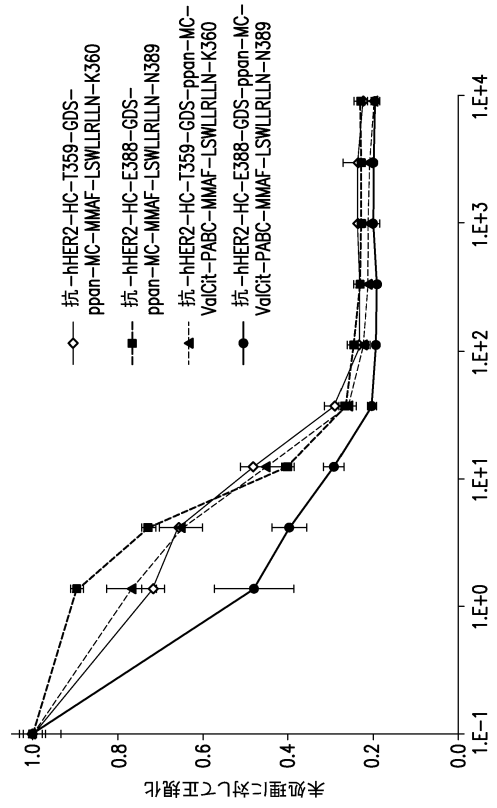


図17

【図１８】

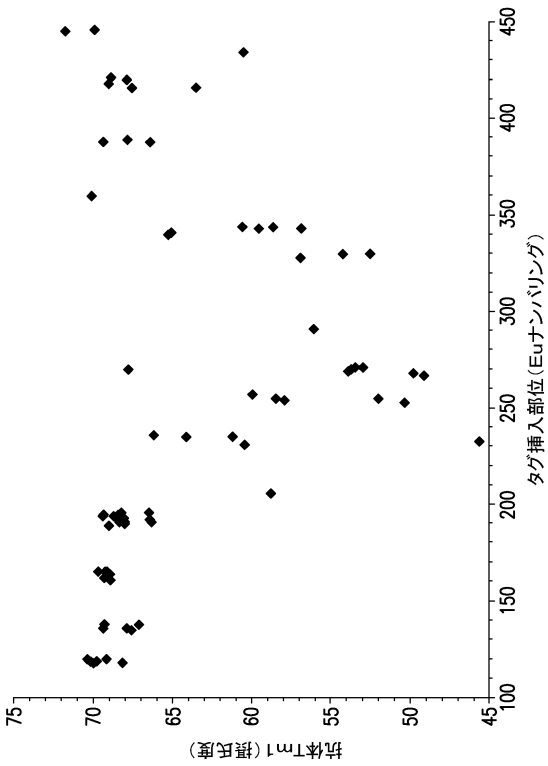


図18

【図１９－Ａ】

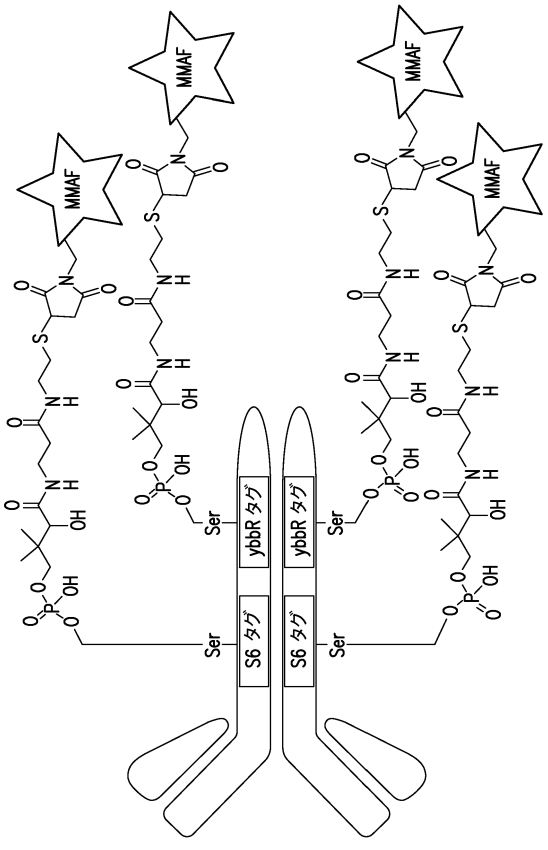


図19A

【図１９－Ｂ】

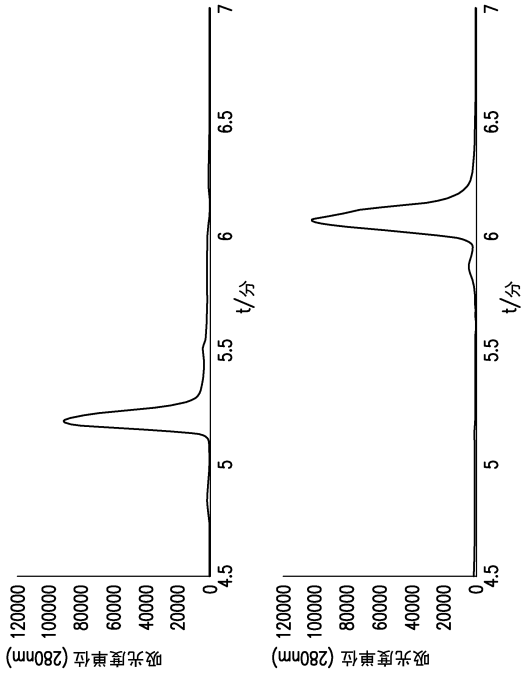


図19B

【図２０－１】

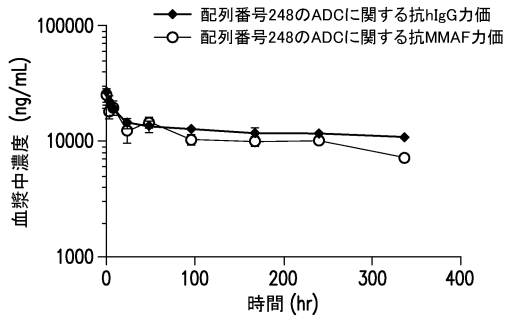


図20A

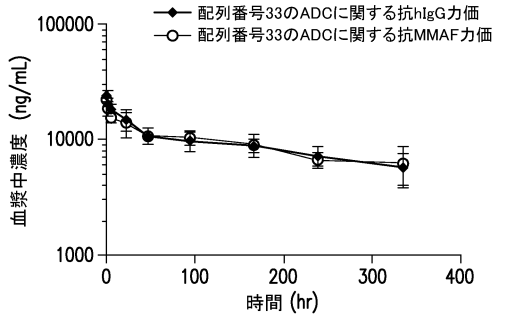


図20B

【図２０－２】

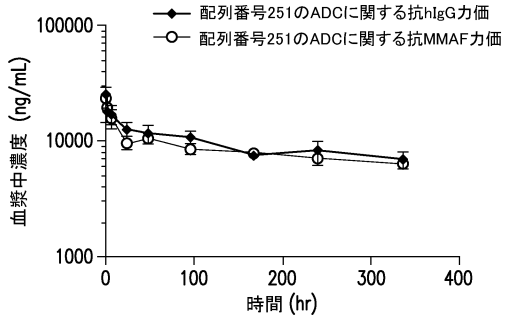


図20C

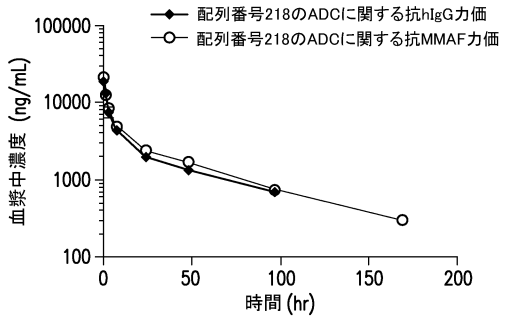


図20D

【図２０－３】

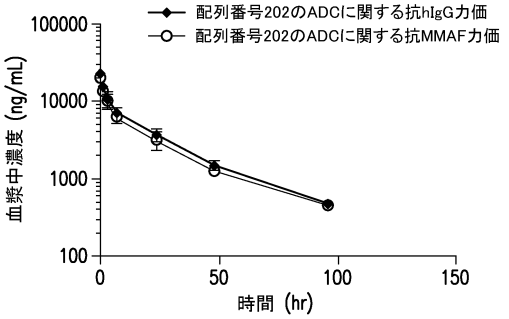


図20E

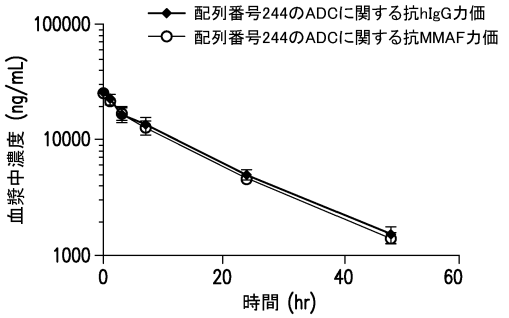


図20F

【図２１】

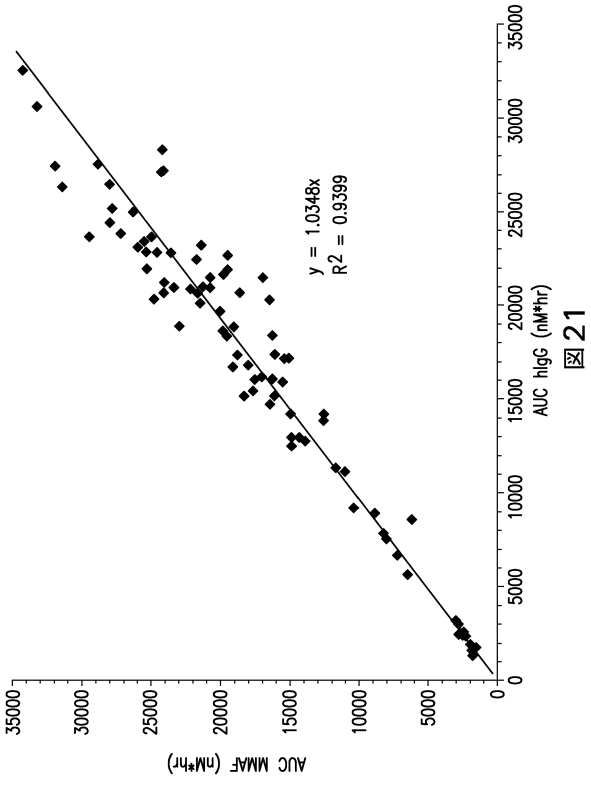


図21

【図２２】

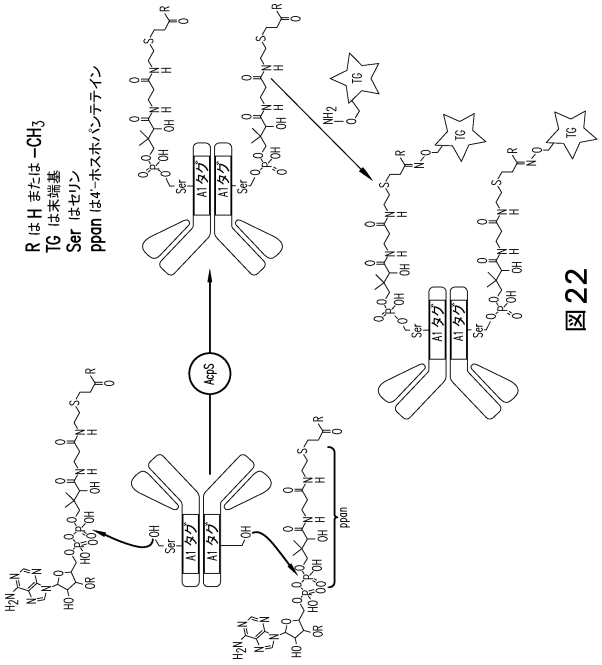


図22

【図２３】

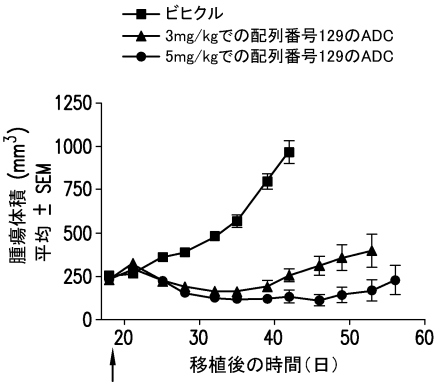


図23

【配列表】

0006321633000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P	21/08	
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	L
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	N
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	T
A61P 31/00	*(2006.01)*	A61P	29/00	
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61K 38/17	*(2006.01)*	A61P	31/00	
A61K 47/66	*(2017.01)*	A61K	45/00	
A61K 47/68	*(2017.01)*	A61K	38/17	100
A61K 51/10	*(2006.01)*	A61K	47/66	
		A61K	47/68	
		A61K	51/10	100
		A61K	51/10	200

(72)発明者 ガイアースタンガー, バーナード フーベルト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス ドライブ 10675, ジェノミクス インスティチュート オブ ザ ノバルティス リサーチ ファンデーション（ジーエヌエフ）, ノバルティス インスティチュート フォー ファンクショナル ジェノミクス, インコーポレイテッド
(72)発明者 グルンワルド, ジャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス ドライブ 10675, ジェノミクス インスティチュート オブ ザ ノバルティス リサーチ ファンデーション（ジーエヌエフ）, ノバルティス インスティチュート フォー ファンクショナル ジェノミクス, インコーポレイテッド
(72)発明者 バースラヤ, バドリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス ドライブ 10675, ジェノミクス インスティチュート オブ ザ ノバルティス リサーチ ファンデーション（ジーエヌエフ）, ノバルティス インスティチュート フォー ファンクショナル ジェノミクス, インコーポレイテッド

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第2007／041689（WO, A1）
国際公開第2010／108153（WO, A1）
特表2011－509675（JP, A）
特表2008－514201（JP, A）
特表2011－514149（JP, A）
Nature Protocols, 2006年, vol.1,no.1, p.280-285
PNAS, 2005年, vol.102,no.44, p.15815-15820
ACS CHEMICAL BIOLOGY, 2007年, vol.2,no.5, p.337-346

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15／00－15／90
C07K
CAplus／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS／WPIDS（STN）