

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7413999号  
(P7413999)

(45)発行日 令和6年1月16日(2024.1.16)

(24)登録日 令和6年1月5日(2024.1.5)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 K 7/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/00 Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00

請求項の数 31 (全357頁)

(21)出願番号	特願2020-525702(P2020-525702)	(73)特許権者	000000066
(86)(22)出願日	令和1年6月14日(2019.6.14)		味の素株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/023778		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87)国際公開番号	WO2019/240287	(74)代理人	110002147
(87)国際公開日	令和1年12月19日(2019.12.19)		弁理士法人酒井国際特許事務所
審査請求日	令和4年5月25日(2022.5.25)	(72)発明者	山田 慧
(31)優先権主張番号	特願2018-113953(P2018-113953)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(32)優先日	平成30年6月14日(2018.6.14)	(72)発明者	藤井 友博
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(31)優先権主張番号	特願2018-205446(P2018-205446)	(72)発明者	敷田 奈都紀
(32)優先日	平成30年10月31日(2018.10.31)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(72)発明者	新保 和高

最終頁に続く

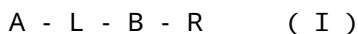
(54)【発明の名称】 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩であって、

前記化合物が、下記式(I)：



〔式中、

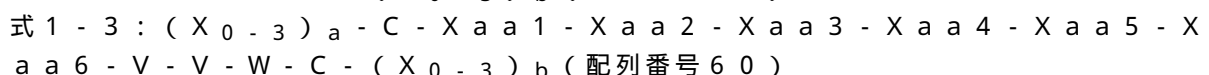
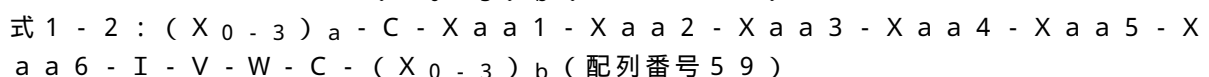
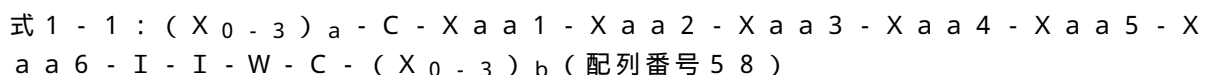
Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である。〕で表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、



式 1 - 4 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - A - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 61)

式 1 - 5 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - L - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 62)

式 1 - 6 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - I - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 63)

式 1 - 7 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - V - F - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 64)

式 1 - 8 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - Q - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 65)

式 1 - 9 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - E - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 66)

〔式中、

$(X_{0-3})_a$  は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 (リジン残基およびシステイン残基以外) であり、

$(X_{0-3})_b$  は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 (リジン残基およびシステイン残基以外) であり、

$X_{aa1}$  は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

$X_{aa2}$  は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

$X_{aa3}$  は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

$X_{aa4}$  は、リジン残基であり、

$X_{aa5}$  は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

$X_{aa6}$  は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。〕、あるいは

式 2 - 1 :  $(X_{0-3'})_a - C - X_{aa1'} - X_{aa2'} - X_{aa3'} - X_{aa4'} - X_{aa5'} - X_{aa6'} - L - V - W - C - (X_{0-3'})_b$  (配列番号 67)

〔式中、

$(X_{0-3'})_a$  および  $(X_{0-3'})_b$  はそれぞれ、前記  $(X_{0-3})_a$  および  $(X_{0-3})_b$  と同じであり、

$X_{aa1'}$ 、 $X_{aa2'}$ 、 $X_{aa3'}$ 、 $X_{aa4'}$ 、 $X_{aa5'}$ 、 $X_{aa6'}$  はそれぞれ、前記  $X_{aa1}$ 、 $X_{aa2}$ 、 $X_{aa3}$ 、 $X_{aa4}$ 、 $X_{aa5}$ 、 $X_{aa6}$  と同じである。

但し、 $(X_{0-3'})_a$  が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、 $(X_{0-3'})_b$  が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、 $X_{aa3'}$  がヒスチジン残基、かつ、 $X_{aa5'}$  がグリシン残基の場合を除く。〕のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、化合物またはその塩。

【請求項 2】

$(X_{0-3})_a$  は、なし、アルギニン残基 - グリシン残基 - アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、またはアスパラギン残基であり、

$(X_{0-3})_b$  は、なし、スレオニン残基 - チロシン残基 - ヒスチジン残基、またはスレオニン残基であり、

$X_{aa1}$  は、アラニン残基であり、

$X_{aa2}$  は、チロシン残基、トリプトファン残基、またはヒスチジン残基であり、

10

20

30

40

50

X a a 6 は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基である、請求項 1 記載の化合物またはその塩。

【請求項 3】

( X 0 - 3 ) a は、グリシン残基 - アスパラギン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であり、

( X 0 - 3 ) b は、スレオニン残基 - チロシン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であり、

X a a 1 は、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X a a 2 は、フェニルアラニン残基であり、

X a a 6 は、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である、請求項 1 記載の化合物またはその塩。

【請求項 4】

抗体に対する親和性物質が、下記からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の化合物またはその塩：

( 1 ) R G N C A Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 5 ) ;

( 2 ) R G N C A Y H K G Q I V W C T Y H ( 配列番号 8 ) ;

( 3 ) R G N C A Y H K G Q V V W C T Y H ( 配列番号 9 ) ;

( 4 ) R G N C A Y H K G Q A V W C T Y H ( 配列番号 1 0 ) ;

( 5 ) R G N C A Y H K G Q L L W C T Y H ( 配列番号 1 1 ) ;

( 6 ) R G N C A Y H K G Q L I W C T Y H ( 配列番号 1 2 ) ;

( 7 ) D C A Y H K G Q I V W C T ( 配列番号 1 3 ) ;

( 8 ) D C A Y H K G Q V V W C T ( 配列番号 1 4 ) ;

( 9 ) D C A Y H K G Q A V W C T ( 配列番号 1 5 ) ;

( 1 0 ) R G N C A Y H K S Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 6 ) ;

( 1 1 ) R G N C A Y H K N Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 7 ) ;

( 1 2 ) R G N C A Y H K D Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 8 ) ;

( 1 3 ) R G N C A Y H K Q Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 9 ) ;

( 1 4 ) R G N C A Y H K E Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 0 ) ;

( 1 5 ) R G N C A Y H K F Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 1 ) ;

( 1 6 ) R G N C A Y H K Y Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 2 ) ;

( 1 7 ) R G N C A Y H K W Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 3 ) ;

( 1 8 ) R G N C A Y H K H Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 4 ) ;

( 1 9 ) R G N C A Y H K T Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 5 ) ;

( 2 0 ) R G N C A Y H K L Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 6 ) ;

( 2 1 ) C A Y H K L Q I V W C ( 配列番号 2 7 ) ;

( 2 2 ) C A Y H K L Q L I W C ( 配列番号 2 8 ) ;

( 2 3 ) C A Y H K S Q I V W C ( 配列番号 2 9 ) ;

( 2 4 ) R G N C A Y H K G Q L V F C T Y H ( 配列番号 3 0 ) ;

( 2 5 ) R G N C A Y H K G Q Q V W C T Y H ( 配列番号 3 1 ) ;

( 2 6 ) R G N C A Y H K G Q E V W C T Y H ( 配列番号 3 2 ) ;

( 2 7 ) C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 3 3 ) ;

( 2 8 ) R G N C A Y H K A Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 4 ) ;

( 2 9 ) R G N C A Y H K V Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 5 ) ;

( 3 0 ) R G N C A Y H K L Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 6 ) ;

( 3 1 ) R G N C A Y H K I Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 7 ) ;

( 3 2 ) R G N C A Y H K S Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 8 ) ;

( 3 3 ) R G N C A Y H K T Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 9 ) ;

( 3 4 ) R G N C A Y H K N Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 0 ) ;

( 3 5 ) R G N C A Y H K D Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 1 ) ;

10

20

30

40

50

- ( 3 6 ) R G N C A Y H K Q Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 2 ) ;  
 ( 3 7 ) R G N C A Y H K E Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 3 ) ;  
 ( 3 8 ) R G N C A Y H K F Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 4 ) ;  
 ( 3 9 ) R G N C A Y H K R Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 5 ) ;  
 ( 4 0 ) R G N C A Y H K H Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 6 ) ;  
 ( 4 1 ) R G N C A Y H K W Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 7 ) ;  
 ( 4 2 ) R G N C A Y H K Y Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 8 ) ;  
 ( 4 3 ) R G N C A Y F K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 9 ) ;  
 ( 4 4 ) R G N C A Y Y K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 0 ) ;  
 ( 4 5 ) R G N C A Y W K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 1 ) ; 10  
 ( 4 6 ) R G N C A Y R K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 2 ) ;  
 ( 4 7 ) R G N C A Y G K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 3 ) ;  
 ( 4 8 ) D C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 5 4 ) ;  
 ( 4 9 ) N C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 5 5 ) ;  
 ( 5 0 ) C A Y H K G Q L V W C T ( 配列番号 5 6 ) ;  
 ( 5 1 ) C A Y H K S Q L V W C ( 配列番号 5 7 ) ;  
 ( 5 2 ) R G N C A W H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 6 8 ) ;  
 ( 5 3 ) R G N C A F H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 6 9 ) ;  
 ( 5 4 ) R G N C A H H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 0 ) ;  
 ( 5 5 ) R G N C G Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 1 ) ; 20  
 ( 5 6 ) R G N C L Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 2 ) ;  
 ( 5 7 ) R G N C P Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 3 ) ;  
 ( 5 8 ) R G N C R Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 4 ) ;  
 ( 5 9 ) R G N C V Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 5 ) ;  
 ( 6 0 ) R G N C N Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 6 ) ;  
 ( 6 1 ) R G N C E Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 7 ) ;  
 ( 6 2 ) R G N C F Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 8 ) ;  
 ( 6 3 ) R G N C A Y H K G E I I W C T Y H ( 配列番号 7 9 ) ;  
 ( 6 4 ) R G N C A Y H K G N I I W C T Y H ( 配列番号 8 0 ) ;  
 ( 6 5 ) R G N C A Y H K G P I I W C T Y H ( 配列番号 8 1 ) ; 30  
 ( 6 6 ) R G N C A Y H K G G I I W C T Y H ( 配列番号 8 2 ) ;  
 ( 6 7 ) R G N C A Y H K G D I I W C T Y H ( 配列番号 8 3 ) ;  
 ( 6 8 ) R G N C A Y H K G R I I W C T Y H ( 配列番号 8 4 ) ;  
 ( 6 9 ) R G N C A Y H K G F I I W C T Y H ( 配列番号 8 5 ) ;  
 ( 7 0 ) R G N C A Y H K G H I I W C T Y H ( 配列番号 8 6 ) ;  
 ( 7 1 ) D C A Y H K G Q I I W C T ( 配列番号 8 7 ) ;  
 ( 7 2 ) N C A Y H K G Q I I W C T ( 配列番号 8 8 ) ;  
 ( 7 3 ) G N C A Y H K G Q I I W C T Y ( 配列番号 8 9 ) ;  
 ( 7 4 ) G C A Y H K G Q I I W C G ( 配列番号 9 0 ) ;  
 ( 7 5 ) G G C A Y H K G Q I I W C G G ( 配列番号 9 1 ) ; および 40  
 ( 7 6 ) G G G C A Y H K G Q I I W C G G G ( 配列番号 9 2 ) 。

【請求項 5】

L が、( i ) 切断により生体直交性官能基を前記反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー、または ( i i ) 切断により生体直交性官能基を前記反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項 6】

前記切断性部分が、( a ) 酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる 1 種以上の物質による処理、( b ) 光からなる群より選ばれる物理化学的的刺激による処理、または ( c ) 自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の

放置のいずれかにより切断可能な部分である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項 7】

前記切断性部分が、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

10

【請求項 8】

前記 ( i ) の切断性部分が、ジスルフィド残基、エステル残基、アセタール残基、ケタール残基、イミン残基、ビシナルジオール残基からなる群より選ばれる、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項 9】

前記 ( i i ) の切断性部分が、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

20

【請求項 10】

生体直交性官能基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、およびセレン残基からなる群より選ばれる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項 11】

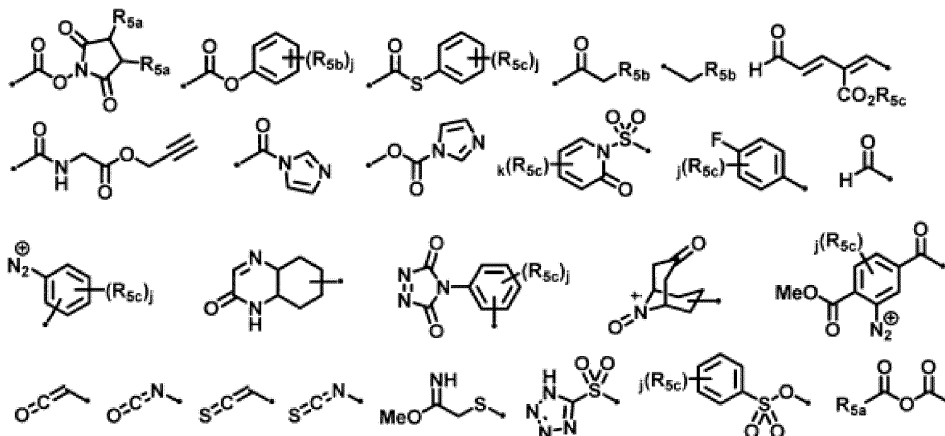
リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基が、活性化エステル残基、ビニルスルホン残基、スルホニルクロライド残基、イソシアネート残基、イソチオシアネート残基、アルデヒド残基、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-テトラ酢酸残基、2-イミノ-2-メトキシエチル残基、またはジアゾニウムテレフタル酸残基である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

30

【請求項 12】

リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基が、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の化合物またはその塩：

【化 1】



40

50

[ここで、

$R_{5a}$ および $R_{5c}$ は、水素原子、または下記：

(i) ハロゲン原子；

(ii) 1価の炭化水素基；

(iii) アラルキル；

(iv) 1価の複素環基；

(v)  $R_c - O -$ 、 $R_c - C(=O) -$ 、 $R_c - O - C(=O) -$ 、もしくは $R_c - C(=O) - O -$  ( $R_c$ は、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；または

(vi)  $NR_d R_e -$ 、 $NR_d R_e - C(=O) -$ 、 $NR_d R_e - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_d - C(=O) - NR_e -$  ( $R_d$ および $R_e$ は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；

(vii) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、もしくはカルボキシル基のいずれかの置換基であり、

$R_{5b}$ は、電子吸引基であり、

$j$ は、1～5の任意の整数であり、

$k$ は、1～4の任意の整数である。]

【請求項13】

以下から選ばれる1以上の特徴を有する、請求項1～12のいずれか一項記載の化合物またはその塩：

(a) AおよびRを連結する主鎖の原子数が4～20個である；

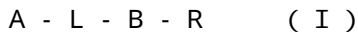
(b) AおよびRを連結する主鎖が環構造を含まない；

(c) L-Bで表される部分構造がペプチド部分を含まない。

【請求項14】

抗体の位置選択的修飾試薬であって、

下記式(I)：



[式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である。]で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、

式1-1： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - I - I - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号58)

式1-2： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - I - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号59)

式1-3： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - V - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号60)

式1-4： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - A - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号61)

式1-5： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - L - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号62)

式1-6： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - I - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号63)

式1-7： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - V - F - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号64)

式1-8： $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - Q - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号65)

10

20

30

40

50

式 1 - 9 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - E - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 6 )

[ 式中、

( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

X<sub>a a 1</sub> は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 2</sub> は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 3</sub> は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X<sub>a a 4</sub> は、リジン残基であり、

X<sub>a a 5</sub> は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

X<sub>a a 6</sub> は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。 ]、あるいは

式 2 - 1 : ( X<sub>0-3'</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1'</sub> - X<sub>a a 2'</sub> - X<sub>a a 3'</sub> - X<sub>a a 4'</sub> - X<sub>a a 5'</sub> - X<sub>a a 6'</sub> - L - V - W - C - ( X<sub>0-3'</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 7 )

[ 式中、

( X<sub>0-3'</sub> )<sub>a</sub> および ( X<sub>0-3'</sub> )<sub>b</sub> はそれぞれ、前記 ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> および ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> と同じであり、

X<sub>a a 1'</sub>、X<sub>a a 2'</sub>、X<sub>a a 3'</sub>、X<sub>a a 4'</sub>、X<sub>a a 5'</sub>、X<sub>a a 6'</sub> はそれぞれ、前記 X<sub>a a 1</sub>、X<sub>a a 2</sub>、X<sub>a a 3</sub>、X<sub>a a 4</sub>、X<sub>a a 5</sub>、X<sub>a a 6</sub> と同じである。

但し、( X<sub>0-3'</sub> )<sub>a</sub> が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、( X<sub>0-3'</sub> )<sub>b</sub> が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、X<sub>a a 3'</sub> がヒスチジン残基、かつ、X<sub>a a 5'</sub> がグリシン残基の場合を除く。 ] のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、試薬。

#### 【請求項 1 5】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩であって、

下記式 ( I I ) :

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

[ 式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、抗体 ヒスチジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。 ] で表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、

式 1 - 1 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - I - I - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 5 8 )

式 1 - 2 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - I - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 5 9 )

10

20

30

40

50

式 1 - 3 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - V - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 60)

式 1 - 4 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - A - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 61)

式 1 - 5 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - L - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 62)

式 1 - 6 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - I - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 63)

式 1 - 7 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - L - V - F - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 64)

10

式 1 - 8 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - Q - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 65)

式 1 - 9 :  $(X_{0-3})_a - C - X_{aa1} - X_{aa2} - X_{aa3} - X_{aa4} - X_{aa5} - X_{aa6} - E - V - W - C - (X_{0-3})_b$  (配列番号 66)

[ 式中、

$(X_{0-3})_a$  は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 (リジン残基およびシステイン残基以外) であり、

$(X_{0-3})_b$  は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 (リジン残基およびシステイン残基以外) であり、

$X_{aa1}$  は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

20

$X_{aa2}$  は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

$X_{aa3}$  は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

$X_{aa4}$  は、リジン残基であり、

$X_{aa5}$  は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

30

$X_{aa6}$  は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。 ]、あるいは

式 2 - 1 :  $(X_{0-3'})_a - C - X_{aa1'} - X_{aa2'} - X_{aa3'} - X_{aa4'} - X_{aa5'} - X_{aa6'} - L - V - W - C - (X_{0-3'})_b$  (配列番号 67)

[ 式中、

$(X_{0-3'})_a$  および  $(X_{0-3'})_b$  はそれぞれ、前記  $(X_{0-3})_a$  および  $(X_{0-3})_b$  と同じであり、

$X_{aa1'}$ 、 $X_{aa2'}$ 、 $X_{aa3'}$ 、 $X_{aa4'}$ 、 $X_{aa5'}$ 、 $X_{aa6'}$  はそれぞれ、前記  $X_{aa1}$ 、 $X_{aa2}$ 、 $X_{aa3}$ 、 $X_{aa4}$ 、 $X_{aa5}$ 、 $X_{aa6}$  と同じである。

但し、 $(X_{0-3'})_a$  が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、 $(X_{0-3'})_b$  が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、 $X_{aa3'}$  がヒスチジン残基、かつ、 $X_{aa5'}$  がグリシン残基の場合を除く。 ] のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、抗体またはその塩。

【請求項 16】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 15 記載の抗体またはその塩。

【請求項 17】

抗体が IgG 抗体である、請求項 15 または 16 記載の抗体またはその塩。

【請求項 18】

50



抗体がヒト由来である、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 19】

抗体が、下記 (A) ~ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つの Fc 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項記載の抗体またはその塩：

(A) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む Fc 領域タンパク質；

(B) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む Fc 領域タンパク質；または

(C) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む Fc 領域タンパク質。

10

【請求項 20】

抗体が、連続する 1 ~ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含み、

A - L - B - R' で表される構造単位が、前記標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 21】

前記標的領域が、連続する 1 ~ 10 個のアミノ酸残基からなる領域である、請求項 20 記載の抗体またはその塩。

20

【請求項 22】

前記標的領域が、連続する 1 ~ 3 個のアミノ酸残基からなる領域である、請求項 21 記載の抗体またはその塩。

【請求項 23】

前記標的領域が、ヒト IgG Fc 領域における 246 ~ 248 位のアミノ酸残基からなる領域である、請求項 22 記載の抗体またはその塩。

【請求項 24】

前記位置選択性が 50% 以上である、請求項 20 ~ 23 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 25】

前記位置選択性が 70% 以上である、請求項 24 記載の抗体またはその塩。

30

【請求項 26】

前記位置選択性が 90% 以上である、請求項 25 記載の抗体またはその塩。

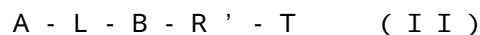
【請求項 27】

式 (II) 中の抗体が、A - L - B - R' で表される構造単位を複数有する、請求項 15 ~ 26 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 28】

生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

下記式 (II)：



40

〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、抗体とジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (IV)：

50

L 1 - B - R ' - T ( I V )

[ 式中、

B、R'およびTは、前記式( I I )のものと同じであり、

L 1 は、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。] で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、

式 1 - 1 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - I - I - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 5 8 )

式 1 - 2 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - I - V - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 5 9 )

10

式 1 - 3 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - V - V - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 0 )

式 1 - 4 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - A - V - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 1 )

式 1 - 5 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - L - L - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 2 )

式 1 - 6 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - L - I - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 3 )

式 1 - 7 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - L - V - F - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 4 )

20

式 1 - 8 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - Q - V - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 5 )

式 1 - 9 : ( X 0 - 3 ) a - C - X a a 1 - X a a 2 - X a a 3 - X a a 4 - X a a 5 - X a a 6 - E - V - W - C - ( X 0 - 3 ) b ( 配列番号 6 6 )

[ 式中、

( X 0 - 3 ) a は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基(リジン残基およびシステイン残基以外)であり、

( X 0 - 3 ) b は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基(リジン残基およびシステイン残基以外)であり、

30

X a a 1 は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X a a 2 は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X a a 3 は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X a a 4 は、リジン残基であり、

X a a 5 は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

40

X a a 6 は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。]、あるいは

式 2 - 1 : ( X 0 - 3 ' ) a - C - X a a 1 ' - X a a 2 ' - X a a 3 ' - X a a 4 ' - X a a 5 ' - X a a 6 ' - L - V - W - C - ( X 0 - 3 ' ) b ( 配列番号 6 7 )

[ 式中、

( X 0 - 3 ' ) a および ( X 0 - 3 ' ) b はそれぞれ、前記 ( X 0 - 3 ) a および ( X 0 - 3 ) b と同じであり、

50

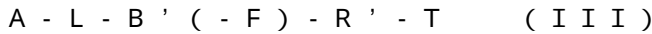
X a a 1 '、X a a 2 '、X a a 3 '、X a a 4 '、X a a 5 '、X a a 6 ' はそれぞれ、前記 X a a 1、X a a 2、X a a 3、X a a 4、X a a 5、X a a 6 と同じである。

但し、( X 0 - 3 ' )<sub>a</sub> が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、( X 0 - 3 ' )<sub>b</sub> が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、X a a 3 ' がヒスチジン残基、かつ、X a a 5 ' がグリシン残基の場合を除く。] のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

【請求項 2 9】

機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

下記式 ( I I I ) :



10

[ 式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B ' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

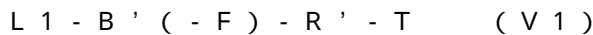
F は、機能性物質であり、

R ' は、抗体ヒスチジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。] で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

20

下記式 ( V 1 ) :

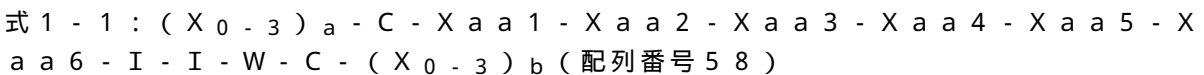


[ 式中、

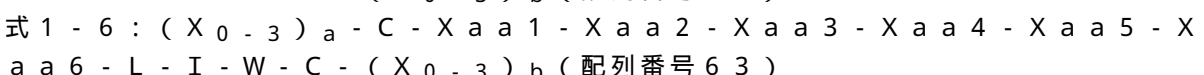
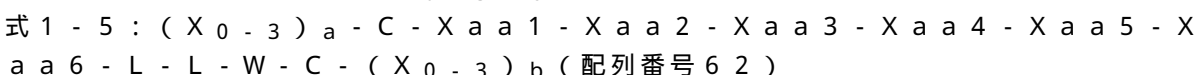
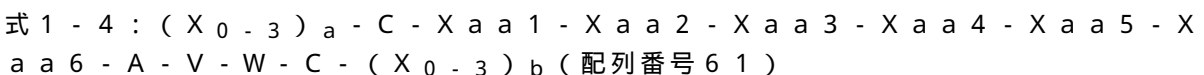
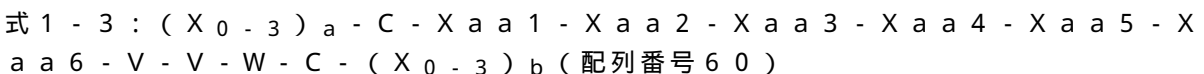
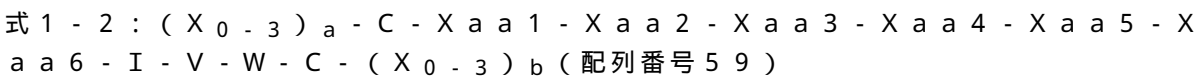
L 1 は、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B '、F、R ' および T は、前記式 ( I I I ) のものと同じである。] で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

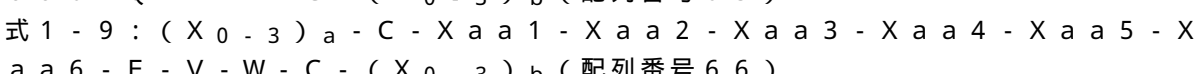
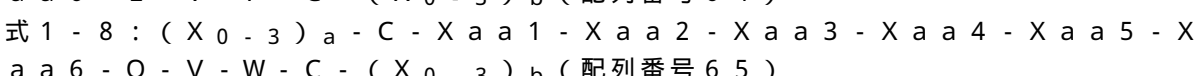
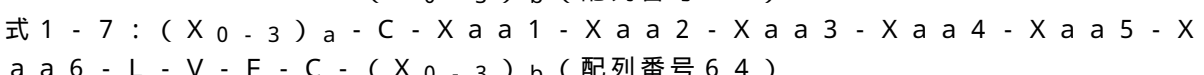
抗体に対する親和性物質が、



30



40



[ 式中、

( X 0 - 3 )<sub>a</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

( X 0 - 3 )<sub>b</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残

50

基（リジン残基およびシステイン残基以外）であり、

X a a 1 は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X a a 2 は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

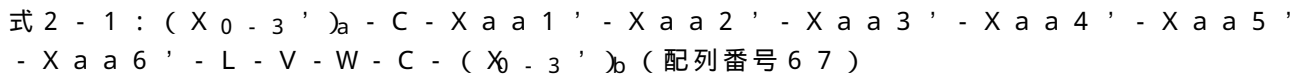
X a a 3 は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X a a 4 は、リジン残基であり、

X a a 5 は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

10

X a a 6 は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。〕、あるいは



〔式中、

( X 0 - 3 ' ) a および ( X 0 - 3 ' ) b はそれぞれ、前記 ( X 0 - 3 ) a および ( X 0 - 3 ) b と同じであり、

20

X a a 1 ' 、 X a a 2 ' 、 X a a 3 ' 、 X a a 4 ' 、 X a a 5 ' 、 X a a 6 ' はそれぞれ、前記 X a a 1 、 X a a 2 、 X a a 3 、 X a a 4 、 X a a 5 、 X a a 6 と同じである。

但し、( X 0 - 3 ' ) a が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、( X 0 - 3 ' ) b が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、X a a 3 ' がヒスチジン残基、かつ、X a a 5 ' がグリシン残基の場合を除く。〕のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

【請求項 3 0】

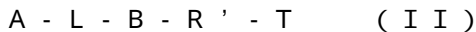
式 ( I I I ) 中の抗体が、A - L - B ' ( - F ) - R ' で表される構造単位を複数有する、請求項 2 9 記載の方法。

30

【請求項 3 1】

機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

( A ) 下記式 ( I I ) :



〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R ' は、抗体とリジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

40

T は、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 ( I V ) :



〔式中、

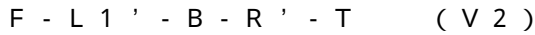
B、R ' および T は、前記式 ( I I ) のものと同じであり、

L 1 は、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること、ならびに

50

( B ) 前記生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を、 1 種または 2 種以上の機能性物質と反応させて、

下記式 ( V 2 )



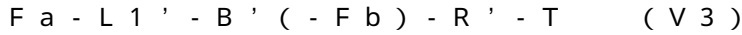
[ 式中、

B、R' および T は、前記式 ( I V ) のものと同じであり、

L 1' は、機能性物質と、( i' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。 ]、または

下記式 ( V 3 ) :



[ 式中、

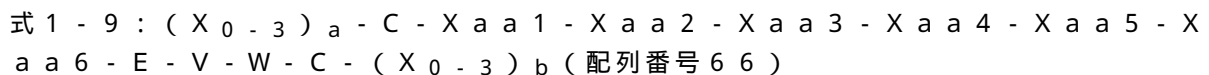
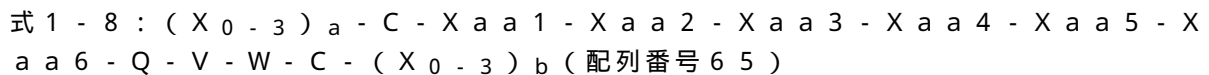
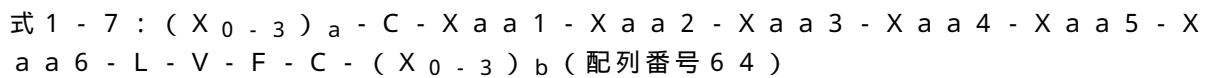
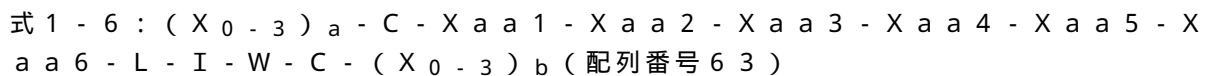
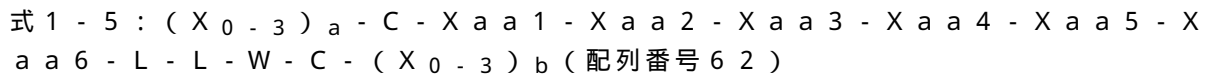
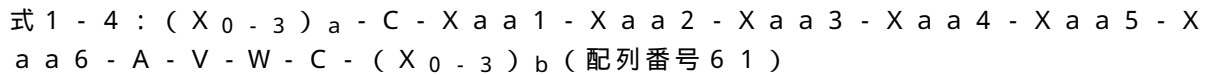
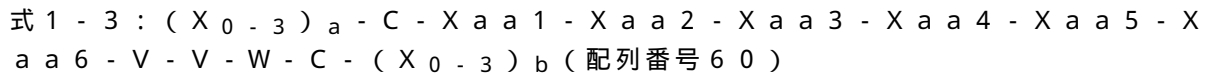
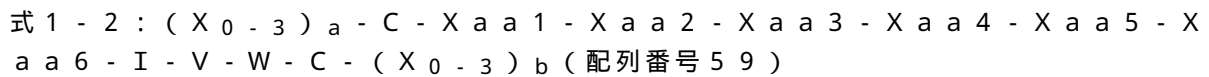
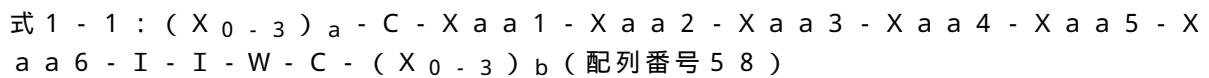
R' および T は、前記式 ( I V ) のものと同じであり、

L 1' は、前記式 ( V 2 ) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。 ] で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、



[ 式中、

( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

X<sub>aa1</sub> は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>aa2</sub> は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>aa3</sub> は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X<sub>aa4</sub> は、リジン残基であり、

10

20

30

40

50

X a a 5 は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

X a a 6 は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。]、あるいは

式 2 - 1 :  $(X_0 - 3')_a - C - X a a 1' - X a a 2' - X a a 3' - X a a 4' - X a a 5' - X a a 6' - L - V - W - C - (X_0 - 3')_b$  (配列番号 6 7)

[式中、

$(X_0 - 3')_a$  および  $(X_0 - 3')_b$  はそれぞれ、前記  $(X_0 - 3)_a$  および  $(X_0 - 3)_b$  と同じであり、

X a a 1'、X a a 2'、X a a 3'、X a a 4'、X a a 5'、X a a 6' はそれぞれ、前記 X a a 1、X a a 2、X a a 3、X a a 4、X a a 5、X a a 6 と同じである。

但し、 $(X_0 - 3')_a$  が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、 $(X_0 - 3')_b$  が 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、X a a 3' がヒスチジン残基、かつ、X a a 5' がグリシン残基の場合を除く。]のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩などに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、抗体薬物複合体 (Antibody - Drug Conjugate : ADC) の研究開発が盛んに行われている。ADC はその名の通り、抗体に薬物 (例、抗がん剤) をコンジュゲーションした薬剤であり、がん細胞などに対して直接的な殺細胞活性を有する。代表的な ADC としては、T - DM 1 (商品名 : カドサイラ (登録商標)) がある (非特許文献 1 ~ 3)。

【0003】

T - DM 1 を始めとする ADC は、開発当初からその不均一性が問題となっている。すなわち、抗体中に 70 ~ 80 程度ある L y s 残基に対して、低分子薬物をランダムに反応させているため、薬物抗体比 (Drug / Antibody Ratio : DAR) やコンジュゲーション位置が一定ではない。通常このようなランダムコンジュゲーション法になると DAR が 0 ~ 8 の範囲となり、薬物の結合数が異なる複数の薬剤が生じることが分かっている。近年 ADC の薬物の結合数および結合位置を変化させると、体内動態や薬物の放出速度、効果が変化することが報告されている。これらのことから次世代型 ADC ではコンジュゲーションする薬物の個数と位置を制御することが求められている。個数および位置が一定であると、期待通りの e f f i c a c y、コンジュゲーション薬剤のバリエーション、ロット差いわゆるレギュレーションの問題が解決すると考えられている (非特許文献 4)。

【0004】

抗体の位置選択的修飾法は世界中で研究されているが、そのほとんどが遺伝子工学的的手法もしくは酵素を用いた修飾法である。遺伝子工学的修飾法に関しては、位置選択性、個数選択性は制御できるものの、抗体自体の発現効率が低下 (ADC を調製する際の総収率が低下) するなどの問題が指摘されている。また、抗体発現系の構築などに長い年月を要することが問題となっている (非特許文献 5 ~ 7)。

【0005】

また、小分子プローブを利用して細胞内のような夾雑な環境下でタンパク質を化学修飾

10

20

30

40

50

する方法が近年報告されている。本手法は、イメージングや低分子薬物のリポジショニングを行う上で受容体の同定などに利用されている。また、ケミカルバイオロジー分野において、合成小分子プローブを用いた有機化学的なタンパク質修飾法が注目されている（非特許文献 8～10）。

【0006】

最近、CCAP (Chemical Conjugation by Affinity Peptide) 法が開発された。本方法は、親和性ペプチド (Affinity Peptide) に対して NHS 活性化エステルおよび薬物が連結されたペプチド試薬を抗体と反応させる方法（すなわち、ペプチド部分を含むリンカーを介した ADC の作製方法）により、抗体の位置選択的な修飾に成功している。本方法は世界で初めて、化学合成的手法により、薬物で抗体 Fc 領域を位置選択的に修飾することに成功したものであり、しかも実用上も良好な結果〔反応時間 30 分、収率 70% (DAR 1 の場合)、位置選択性 100%〕が確認されている。ペプチド試薬を 5 等量程度加えることで、DAR を 2 で制御できることが実証されており、修飾位置も制御できる点で画期的である（特許文献 1）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】国際公開第 2016/186206 号

【非特許文献】

【0008】

20

【文献】Reichert JM et al., Nat Biotechnol 2005; 23: 1073-8

【文献】Kubota T et al., Cancer Sci 2009; 100: 1566-72

【文献】Wu AM et al., Nat Biotechnol 2005; 23: 1137-46

【文献】Junutula JR et al., Nat Biotechnol 2008; 26: 925-32

【文献】Shen BQ et al., Nat Biotechnol 2012; 30: 184-9

30

【文献】Hofer T et al., Biochemistry 2009; 48: 12047-57

【文献】Liu W et al., Nat Methods 2007; 4: 239-44

【文献】S.T. Laughlin et al., Science 2008; 320, 664

【文献】A.E. Speers et al., ChemBioChem 2004; 5, 41

【文献】Y. Takaoka et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013; 52, 4088

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、抗体の修飾、特に、抗体の位置選択的な修飾を可能にする技術を開発することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意検討した結果、(1) 抗体に対する親和性物質、および(2) その抗体を構成するアミノ酸残基に対する反応性基、ならびに(3) 当該親和性物質と当該反応性基との間に切断性部分を含み、(4) 切断性部分での切断により生体直交性官能基を反応性基側に有する構造単位（すなわち、生体直交性官能基および反応性基を含む構造単

50

位)を生成できるという構造的特徴を有する、新規かつ独創的な設計思想に基づき開発された化合物が、抗体の位置特異的な修飾に有用であることを見出した(例、図1-1、図1-2、図1-3、図2)。本発明者らはまた、このような化合物を用いることにより、ペプチド部分をリンカーとして含まない、機能性物質(例、薬物)を位置選択的に有する抗体(例、抗体薬物複合体(ADC))を調製できることなどを見出した。潜在的な免疫原性を有し、また血中で加水分解され易いペプチド部分を含むリンカーの使用の回避は、ADCの臨床応用において望ましいものである。すなわち、本発明者らの開発した方法は世界で初めて、化学合成的手法により、しかもペプチド部分を含むリンカーを使用することなく、薬物で抗体Fc領域を位置選択的に修飾することに成功したといえることができる。本発明者らはまた、上記(1)~(4)のような構造的特徴を具備する種々の化合物の開発などに成功し(例、図1-1、図1-2、図1-3、図2)、本発明を完成するに至った。

10

【0011】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

【0012】

第1の実施形態では、本発明は、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩、ならびに当該化合物またはその塩を含む、抗体の位置選択的修飾試薬を提供する。

(1)抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩であって、

20

前記化合物が、下記式(I)：

A-L-B-R (I)

[式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記抗体に対する反応性基である。]で表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、

式1-1：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-I-I-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号58)

30

式1-2：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-I-V-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号59)

式1-3：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-V-V-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号60)

式1-4：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-A-V-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号61)

式1-5：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-L-L-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号62)

式1-6：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-L-I-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号63)

40

式1-7：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-L-V-F-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号64)

式1-8：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-Q-V-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号65)

式1-9：(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>-C-X<sub>aa1</sub>-X<sub>aa2</sub>-X<sub>aa3</sub>-X<sub>aa4</sub>-X<sub>aa5</sub>-X<sub>aa6</sub>-E-V-W-C-(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>(配列番号66)

[式中、

(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>は、なし、または1~3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基(リジン残基およびシステイン残基以外)であり、

50



(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>は、なし、または1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基（リジン残基およびシステイン残基以外）であり、

X<sub>a a 1</sub>は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 2</sub>は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 3</sub>は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X<sub>a a 4</sub>は、リジン残基であり、

X<sub>a a 5</sub>は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

X<sub>a a 6</sub>は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。）、あるいは

式2-1: (X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub>' - X<sub>a a 2</sub>' - X<sub>a a 3</sub>' - X<sub>a a 4</sub>' - X<sub>a a 5</sub>' - X<sub>a a 6</sub>' - L - V - W - C - (X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub> (配列番号67)

〔式中、

(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>および(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>はそれぞれ、前記(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>および(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>と同じであり、

X<sub>a a 1</sub>'、X<sub>a a 2</sub>'、X<sub>a a 3</sub>'、X<sub>a a 4</sub>'、X<sub>a a 5</sub>'、X<sub>a a 6</sub>'はそれぞれ、前記X<sub>a a 1</sub>、X<sub>a a 2</sub>、X<sub>a a 3</sub>、X<sub>a a 4</sub>、X<sub>a a 5</sub>、X<sub>a a 6</sub>と同じである。

但し、(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>が1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>が1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基、X<sub>a a 3</sub>'がヒスチジン残基、かつ、X<sub>a a 5</sub>'がグリシン残基の場合を除く。〕のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、化合物またはその塩。

〔2〕(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>は、なし、アルギニン残基 - グリシン残基 - アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、またはアスパラギン残基であり、

(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>は、なし、スレオニン残基 - チロシン残基 - ヒスチジン残基、またはスレオニン残基であり、

X<sub>a a 1</sub>は、アラニン残基であり、

X<sub>a a 2</sub>は、チロシン残基、トリプトファン残基、またはヒスチジン残基であり、

X<sub>a a 6</sub>は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基である、〔1〕の化合物またはその塩。

〔3〕(X<sub>0-3</sub>)<sub>a</sub>は、グリシン残基 - アスパラギン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であり、

(X<sub>0-3</sub>)<sub>b</sub>は、スレオニン残基 - チロシン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であり、

X<sub>a a 1</sub>は、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 2</sub>は、フェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 6</sub>は、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である、〔1〕の化合物またはその塩。

〔4〕抗体に対する親和性物質が、下記からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含むペプチドである、〔1〕～〔3〕のいずれかの化合物またはその塩：

(1) R G N C A Y H K G Q I I W C T Y H (配列番号5)；

(2) R G N C A Y H K G Q I V W C T Y H (配列番号8)；

(3) R G N C A Y H K G Q V V W C T Y H (配列番号9)；

10

20

30

40

50

- ( 4 ) R G N C A Y H K G Q A V W C T Y H ( 配列番号 1 0 ) ;
- ( 5 ) R G N C A Y H K G Q L L W C T Y H ( 配列番号 1 1 ) ;
- ( 6 ) R G N C A Y H K G Q L I W C T Y H ( 配列番号 1 2 ) ;
- ( 7 ) D C A Y H K G Q I V W C T ( 配列番号 1 3 ) ;
- ( 8 ) D C A Y H K G Q V V W C T ( 配列番号 1 4 ) ;
- ( 9 ) D C A Y H K G Q A V W C T ( 配列番号 1 5 ) ;
- ( 1 0 ) R G N C A Y H K S Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 6 ) ;
- ( 1 1 ) R G N C A Y H K N Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 7 ) ;
- ( 1 2 ) R G N C A Y H K D Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 8 ) ;
- ( 1 3 ) R G N C A Y H K Q Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 9 ) ;
- ( 1 4 ) R G N C A Y H K E Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 0 ) ;
- ( 1 5 ) R G N C A Y H K F Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 1 ) ;
- ( 1 6 ) R G N C A Y H K Y Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 2 ) ;
- ( 1 7 ) R G N C A Y H K W Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 3 ) ;
- ( 1 8 ) R G N C A Y H K H Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 4 ) ;
- ( 1 9 ) R G N C A Y H K T Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 5 ) ;
- ( 2 0 ) R G N C A Y H K L Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 6 ) ;
- ( 2 1 ) C A Y H K L Q I V W C ( 配列番号 2 7 ) ;
- ( 2 2 ) C A Y H K L Q L I W C ( 配列番号 2 8 ) ;
- ( 2 3 ) C A Y H K S Q I V W C ( 配列番号 2 9 ) ;
- ( 2 4 ) R G N C A Y H K G Q L V F C T Y H ( 配列番号 3 0 ) ;
- ( 2 5 ) R G N C A Y H K G Q Q V W C T Y H ( 配列番号 3 1 ) ;
- ( 2 6 ) R G N C A Y H K G Q E V W C T Y H ( 配列番号 3 2 ) ;
- ( 2 7 ) C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 3 3 ) ;
- ( 2 8 ) R G N C A Y H K A Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 4 ) ;
- ( 2 9 ) R G N C A Y H K V Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 5 ) ;
- ( 3 0 ) R G N C A Y H K L Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 6 ) ;
- ( 3 1 ) R G N C A Y H K I Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 7 ) ;
- ( 3 2 ) R G N C A Y H K S Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 8 ) ;
- ( 3 3 ) R G N C A Y H K T Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 9 ) ;
- ( 3 4 ) R G N C A Y H K N Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 0 ) ;
- ( 3 5 ) R G N C A Y H K D Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 1 ) ;
- ( 3 6 ) R G N C A Y H K Q Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 2 ) ;
- ( 3 7 ) R G N C A Y H K E Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 3 ) ;
- ( 3 8 ) R G N C A Y H K F Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 4 ) ;
- ( 3 9 ) R G N C A Y H K R Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 5 ) ;
- ( 4 0 ) R G N C A Y H K H Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 6 ) ;
- ( 4 1 ) R G N C A Y H K W Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 7 ) ;
- ( 4 2 ) R G N C A Y H K Y Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 8 ) ;
- ( 4 3 ) R G N C A Y F K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 9 ) ;
- ( 4 4 ) R G N C A Y Y K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 0 ) ;
- ( 4 5 ) R G N C A Y W K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 1 ) ;
- ( 4 6 ) R G N C A Y R K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 2 ) ;
- ( 4 7 ) R G N C A Y G K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 3 ) ;
- ( 4 8 ) D C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 5 4 ) ;
- ( 4 9 ) N C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 5 5 ) ;
- ( 5 0 ) C A Y H K G Q L V W C T ( 配列番号 5 6 ) ;
- ( 5 1 ) C A Y H K S Q L V W C ( 配列番号 5 7 ) ;
- ( 5 2 ) R G N C A W H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 6 8 ) ;
- ( 5 3 ) R G N C A F H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 6 9 ) ;

10

20

30

40

50

( 5 4 ) R G N C A H H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 0 ) ;  
 ( 5 5 ) R G N C G Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 1 ) ;  
 ( 5 6 ) R G N C L Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 2 ) ;  
 ( 5 7 ) R G N C P Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 3 ) ;  
 ( 5 8 ) R G N C R Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 4 ) ;  
 ( 5 9 ) R G N C V Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 5 ) ;  
 ( 6 0 ) R G N C N Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 6 ) ;  
 ( 6 1 ) R G N C E Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 7 ) ;  
 ( 6 2 ) R G N C F Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 8 ) ;  
 ( 6 3 ) R G N C A Y H K G E I I W C T Y H ( 配列番号 7 9 ) ;  
 ( 6 4 ) R G N C A Y H K G N I I W C T Y H ( 配列番号 8 0 ) ;  
 ( 6 5 ) R G N C A Y H K G P I I W C T Y H ( 配列番号 8 1 ) ;  
 ( 6 6 ) R G N C A Y H K G G I I W C T Y H ( 配列番号 8 2 ) ;  
 ( 6 7 ) R G N C A Y H K G D I I W C T Y H ( 配列番号 8 3 ) ;  
 ( 6 8 ) R G N C A Y H K G R I I W C T Y H ( 配列番号 8 4 ) ;  
 ( 6 9 ) R G N C A Y H K G F I I W C T Y H ( 配列番号 8 5 ) ;  
 ( 7 0 ) R G N C A Y H K G H I I W C T Y H ( 配列番号 8 6 ) ;  
 ( 7 1 ) D C A Y H K G Q I I W C T ( 配列番号 8 7 ) ;  
 ( 7 2 ) N C A Y H K G Q I I W C T ( 配列番号 8 8 ) ;  
 ( 7 3 ) G N C A Y H K G Q I I W C T Y ( 配列番号 8 9 ) ;  
 ( 7 4 ) G C A Y H K G Q I I W C G ( 配列番号 9 0 ) ;  
 ( 7 5 ) G G C A Y H K G Q I I W C G G ( 配列番号 9 1 ) ; および  
 ( 7 6 ) G G G C A Y H K G Q I I W C G G G ( 配列番号 9 2 ) 。

〔 5 〕 L が、 ( i ) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー、または ( i i ) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーである、〔 1 〕 ~ 〔 4 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 6 〕 L が前記 ( i ) の切断性リンカーである、〔 5 〕 の化合物またはその塩。

〔 7 〕 L が前記 ( i ) の切断性リンカーであり、かつ、 B が前記 ( b ) の 2 価の基である、〔 5 〕 または〔 6 〕 の化合物またはその塩。

〔 8 〕 L が前記 ( i i ) の切断性リンカーであり、かつ、 B が前記 ( a ) の 2 価の基である、〔 5 〕 の化合物またはその塩。

〔 9 〕 ペプチドが、モノクローナル抗体の F c 領域に対する結合性ペプチドである、〔 1 〕 ~ 〔 8 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 1 0 〕 ペプチドが、 I g G の F c 領域に対する結合性ペプチドである、〔 9 〕 の化合物またはその塩。

〔 1 1 〕 前記親和性物質が、下記 ( A ) ~ ( C ) からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体に対する親和性物質である、〔 1 〕 ~ 〔 1 0 〕 のいずれかの化合物またはその塩：

( A ) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；

( B ) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、 1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；または

( C ) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

〔 1 2 〕 ペプチドが、ヒト I g G と結合可能であることを特徴とする、〔 1 〕 ~ 〔 1 1 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 1 3 〕 切断性部分が、 ( a ) 酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる 1 種以上の物質による処理、 ( b ) 光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または ( c ) 自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置のいずれかにより切断可能な部分である、〔 1 〕 ~ 〔 1 2 〕 のいずれかの化合物ま

10

20

30

40

50

たはその塩。

〔 14 〕前記切断性部分が、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、〔 1 〕～〔 13 〕のいずれかの化合物またはその塩。

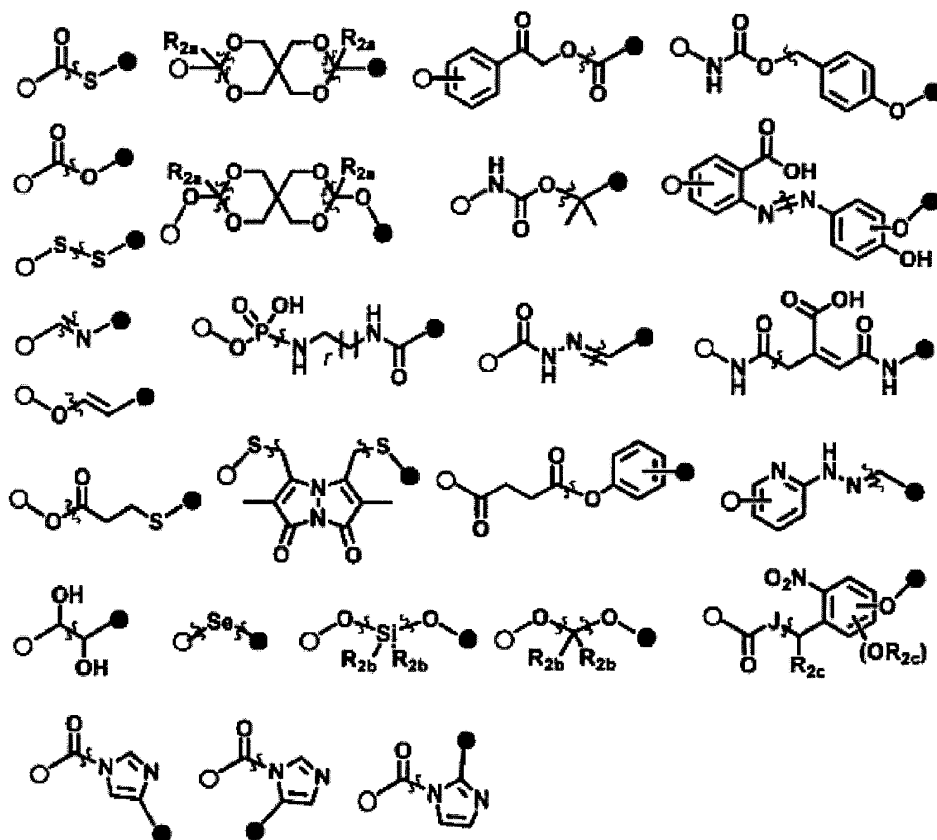
〔 15 〕前記 ( i ) の切断性部分が、ジスルフィド残基、エステル残基、アセタール残基、ケタール残基、イミン残基、ビシナルジオール残基からなる群より選ばれる、〔 5 〕～〔 14 〕のいずれかの化合物またはその塩。

10

〔 16 〕前記 ( i i ) の切断性部分が、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、〔 5 〕～〔 14 〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔 17 〕切断性部分が、下記：

〔化 1 〕



20

30

40

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の R<sub>2a</sub>、複数の R<sub>2b</sub>、および複数の R<sub>2c</sub> は、同一または異なって、

( i ) 水素原子、またはハロゲン原子；

( i i ) 1 価の炭化水素基；

( i i i ) アラルキル；

( i v ) 1 価の複素環基；

( v ) R<sub>c</sub> - O -、R<sub>c</sub> - C ( = O ) -、R<sub>c</sub> - O - C ( = O ) -、もしくは R<sub>c</sub> - C ( = O ) - O - ( R<sub>c</sub> は、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。 ) ；

50

(v i)  $\text{NR}_d\text{R}_e-$ 、 $\text{NR}_d\text{R}_e-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{NR}_d\text{R}_e-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、もしくは $\text{R}_d-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_e-$  ( $\text{R}_d$ および $\text{R}_e$ は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。) ; または

(v i i) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、もしくはカルボキシル基からなる群より選ばれ、

J は、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}-$ であり、

r は、1 ~ 4 の任意の整数であり、

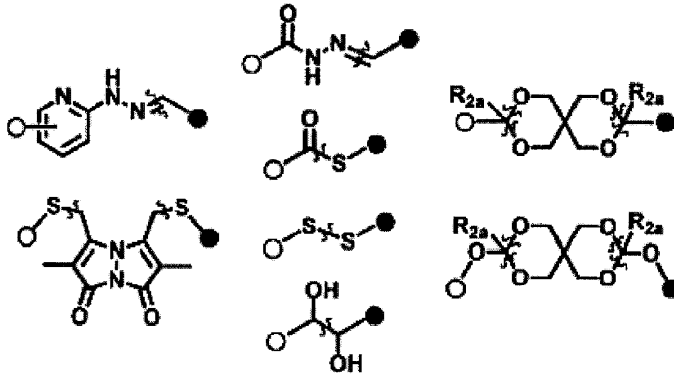
(白丸) は A に対する結合を示し、(黒丸) は B に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、(白丸) が A に対する結合を示し、(黒丸) が B に対する結合を示していてもよい。) からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔1〕~〔16〕のいずれかの化合物またはその塩。

10

〔18〕前記(i)の切断性部分が、以下：

【化2】



20

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

$\text{R}_{2a}$  は、〔23〕と同じであり、

(白丸) は A に対する結合を示し、(黒丸) は B に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、(白丸) が A に対する結合を示し、(黒丸) が B に対する結合を示していてもよい。) からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔5〕~〔13〕、〔15〕、〔17〕のいずれかの化合物またはその塩。

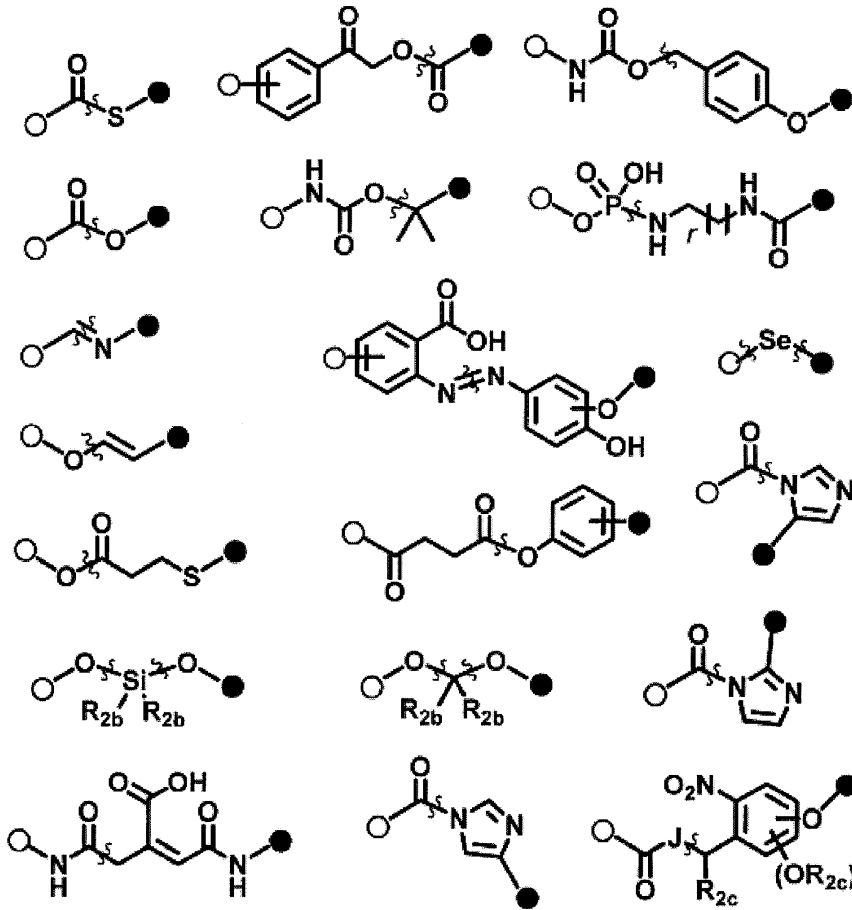
30

〔19〕前記(ii)の切断性部分が、以下：

40

50

## 【化3】



10

20

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

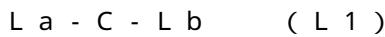
$R_{2b}$ 、 $R_{2c}$ 、 $J$ 、 $r$ は、〔23〕と同じであり、

(白丸)はAに対する結合を示し、(黒丸)はBに対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、〔20〕がAに対する結合を示し、〔21〕がBに対する結合を示していてもよい。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔5〕～〔13〕、〔16〕、〔17〕のいずれかの化合物またはその塩。

30

〔20〕Lが、下記式(L1)～(L3)：



〔式中、

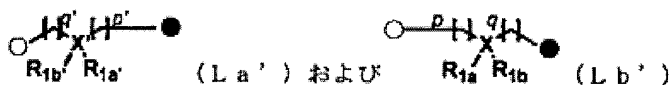
$L a$ および $L b$ は、それぞれ、2価の基であり、

$C$ は、切断性部分である。〕のいずれか一つで表される、〔1〕～〔19〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔21〕前記 $L a$ および $L b$ が、それぞれ、下記( $L a'$ )および( $L b'$ )：

40

## 【化4】



〔式中、

$p$ および $p'$ は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

$q$ および $q'$ は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

$X$ および $X'$ は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合(ここで、 $X$ が窒素原子である場合、 $R_{1b}$ は存在せず、 $X'$ が窒素原子である場合、 $R_{1b}$ は存在しない。 $X$ が単結合である場合、 $R_{1a}$ および $R_{1b}$ は存在せず、 $X'$ が単結合である場合、 $R_{1a}$

50

a および R<sub>1b</sub> は存在しない) であり、

R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は、同一または異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子または基である。) で表される、〔20〕の化合物またはその塩。

〔22〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基である、〔1〕~〔21〕のいずれかの化合物またはその塩。

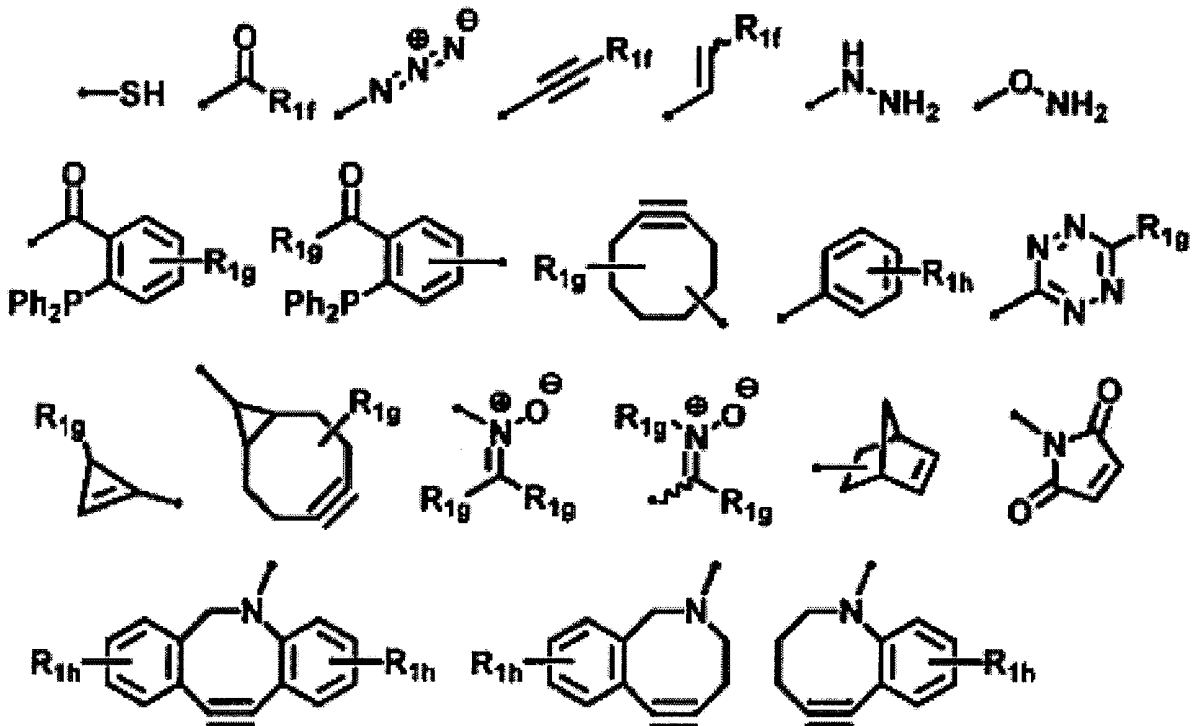
10

〔23〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基である、〔1〕~〔21〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔24〕生体直交性官能基が、下記：

【化5】

20



30

〔式中、

R<sub>1f</sub>、単一もしくは複数の R<sub>1g</sub> および単一もしくは複数の R<sub>1h</sub> は、同一もしくは異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。) で表されるいずれか一つである、〔1〕~〔23〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔25〕前記 (b) の2価の基が、置換されていてもよいアルキレン、置換されていてもよいシクロアルキレン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよい2価の複素環基、-NR<sub>a</sub>- (R<sub>a</sub> は水素原子、または置換基を示す)、-O-、またはこれらの2以上の組み合わせからなる群より選ばれる、〔1〕~〔24〕のいずれかの化合物また

50

はその塩。

〔 2 6 〕 B が、下記式 ( B - 1 ) :

【化 6】



〔 式中、

Y は、 - N H - 、 - O - 、 - C H 2 - 、または下記式 ( B - 2 ) :

【化 7】



〔 式中、

V および V ' は、同一または異なって、 - N H - 、 - O - 、 - C H 2 - 、または単結合であり、

V 1 は、生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

s は、0 ~ 1 0 の任意の整数であり、

式 ( B - 2 ) における および は、それぞれ、式 ( B - 1 ) における および と同じ配向である。) であり、

Z は、酸素原子、硫黄原子、または水素原子 ( Z が水素原子である場合、 - C ( = Z ) - は、 - C H 2 - を示す。) であり、

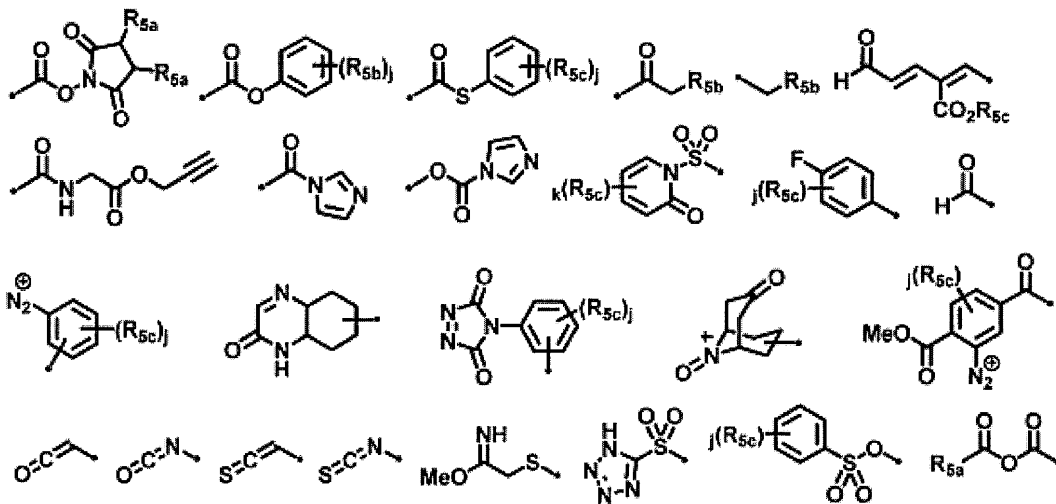
式 ( B - 1 ) における ( 白丸 ) は、L 側の部分に対する結合を示し、 ( 黒丸 ) は R 側の部分に対する結合を示す。〕で表される、〔 1 〕 ~ 〔 2 5 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 2 7 〕 反応性基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基である、〔 1 〕 ~ 〔 2 6 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 2 8 〕 反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔 2 7 〕 の化合物またはその塩。

〔 2 9 〕 反応性基が、下記 :

【化 8】



〔 ここで、

R 5 a および R 5 c は、前記 ( i ) ~ ( v i i ) からなる群より選ばれる原子または基であり、

R 5 b は、電子吸引基であり、

10

20

30

40

50



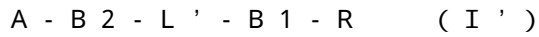
j は、1 ~ 5 の任意の整数であり、  
k は、1 ~ 4 の任意の整数である。] からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔1〕~〔28〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔30〕A および R を連結する主鎖の原子数が 4 ~ 20 個である、〔1〕~〔29〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔31〕A および R を連結する主鎖が環構造を含まない、〔1〕~〔30〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔32〕L - B で表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔1〕~〔31〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔33〕前記式 (I) で表される化合物が、下記 (I') :



〔式中、

A および R は、前記式 (I) のものと同じであり

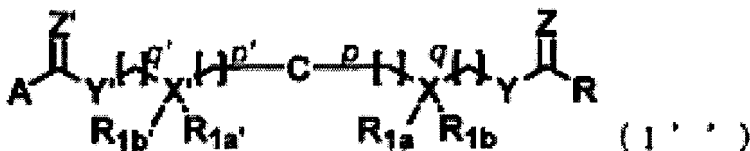
L' は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B<sub>1</sub> および B<sub>2</sub> は、同一または異なって、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

B<sub>1</sub> および B<sub>2</sub> は、L' を中心にした対称構造を有していてもよい。〕で表される化合物である、〔1〕~〔32〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔34〕前記式 (I') で表される化合物が、下記 (I'') :

【化 9】



〔式中、

A および R は、〔1〕記載の式 (I) のものと同じであり、

C は、切断性部分であり、

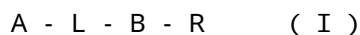
p、p'、q、q'、X、X'、Y、Y'、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、および R<sub>1c</sub> は、〔19〕記載の式 (L a') および (L b') のものと同じであり、

Y および Y' は、同一または異なって、〔24〕記載の式 (B - 1) の Y と同じであり、

Z および Z' は、同一または異なって、前記式 (B - 1) の Z と同じである。〕で表される、〔33〕の化合物またはその塩。

〔35〕抗体の位置選択的修飾試薬であって、

下記式 (I) :



〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

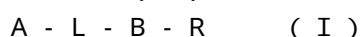
B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、前記抗体に対する反応性基である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド〔好ましくは、上記 (1) ~ (76) からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含むペプチド。以下同様〕である、試薬。

〔36〕抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩であって、

下記式 (I) :



10

20

30

40

50

〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である。〕で表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、化合物またはその塩。

〔 3 7 〕抗体の位置選択的修飾試薬であって、

下記式 ( I ) :

A - L - B - R ( I )

〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、試薬。

【 0 0 1 3 〕

第 2 に、本発明は、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩、およびその製造方法を提供する。

( 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩 )

〔 3 8 〕抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩であって、

下記式 ( I I ) :

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

〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R ' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。〕で表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、抗体またはその塩。

〔 3 9 〕抗体がモノクローナル抗体である、〔 3 8 〕の抗体またはその塩。

〔 4 0 〕抗体が I g G 抗体である、〔 3 8 〕または〔 3 9 〕の抗体またはその塩。

〔 4 1 〕抗体がヒト由来である、〔 3 8 〕 ~ 〔 4 0 〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔 4 2 〕抗体が、下記 ( A ) ~ ( C ) からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、〔 3 8 〕 ~ 〔 4 1 〕のいずれかの抗体またはその塩 :

( A ) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質 ;

( B ) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質 ; または

( C ) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

〔 4 3 〕抗体が、連続する 1 ~ 5 0 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定の

アミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定

10

20

30

40

50

のアミノ酸残基を5個以上含み、

A - L - B - R' で表される構造単位が、前記標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、〔38〕～〔42〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔44〕前記標的領域が、連続する1～10個のアミノ酸残基からなる領域である、〔43〕の抗体またはその塩。

〔45〕前記標的領域が、連続する1～3個のアミノ酸残基からなる領域である、〔44〕の抗体またはその塩。

〔46〕前記標的領域が、ヒトIgG Fc領域における246～248位のアミノ酸残基からなる領域である、〔45〕の抗体またはその塩。

10

〔47〕前記位置選択性が50%以上である、〔43〕～〔46〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔48〕前記位置選択性が70%以上である、〔47〕の抗体またはその塩。

〔49〕前記位置選択性が90%以上である、〔48〕の抗体またはその塩。

〔50〕前記特定のアミノ酸残基が、特定の位置に存在する特定のアミノ酸を中心としてそれぞれN末端側およびC末端側に対してa個(ここで、aは、1～10の任意の整数である)のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、前記特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まない、〔43〕～〔49〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔51〕前記抗体が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

20

Tが、複数個の重鎖中の対応する複数個の標的領域において、A - L - B - R' で表される構造単位を有する結果、前記抗体がA - L - B - R' で表される構造単位を複数個有する、〔38〕～〔50〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔52〕重鎖の個数が2個である、〔51〕の抗体またはその塩。

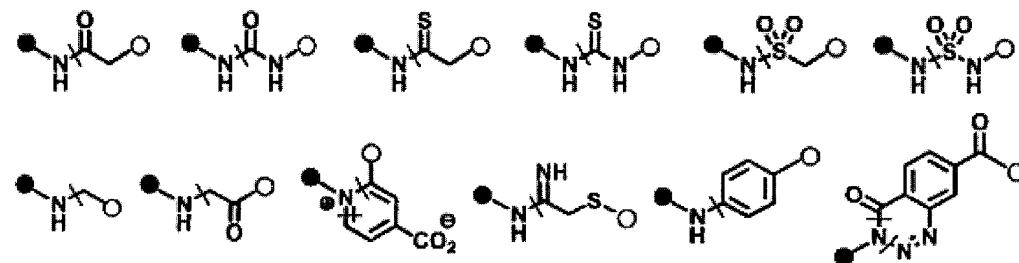
〔53〕抗体と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基に対する、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基の反応により生成する部分である、〔38〕～〔52〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔54〕抗体と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分である、〔38〕～〔53〕のいずれかの抗体またはその塩。

30

〔55〕前記反応により生成する部分が、下記：

【化10】



40

〔ここで、(黒丸)は、T側の部分に対する結合を示し、(白丸)は、B側の部分に対する結合を示す。結合に直交する直線は、反応により生成する結合を示す。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔38〕～〔54〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔56〕AおよびR'を連結する主鎖の原子数が4～20個である、〔38〕～〔55〕のいずれかの抗体またはその塩。

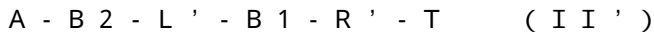
〔57〕AおよびRを連結する主鎖が環構造を含まない、〔38〕～〔56〕のいずれかの抗体またはその塩。

〔58〕L - Bで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔38〕～〔57〕のい

50

ずれかの抗体またはその塩。

〔 5 9 〕 前記式 ( I I ) で表される化合物が、下記 ( I I ' ) :



〔 式中、

A、R' および T は、前記式 ( I I ) のものと同じであり

L' は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

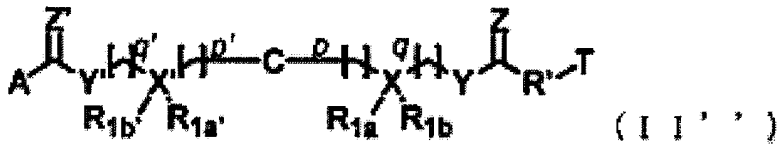
B 1 および B 2 は、同一または異なって、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

B 1 および B 2 は、L' を中心にした対称構造を有していてもよい。〕で表される化合物である、〔 3 8 〕 ~ 〔 5 8 〕 のいずれかの抗体またはその塩。

10

〔 6 0 〕 前記式 ( I I ' ) で表される化合物が、下記 ( I I ' ' ) :

〔 化 1 1 〕



〔 式中、

A、R' および T は、〔 3 6 〕 記載の式 ( I I ) のものと同じであり、

C は、切断性部分であり、

p および p' は、同一または異なって、0 ~ 1 0 の任意の整数であり、

q および q' は、同一または異なって、0 ~ 1 0 の任意の整数であり、

X および X' は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合 (ここで、X が窒素原子である場合、R<sub>1b</sub> は存在せず、X' が窒素原子である場合、R<sub>1b</sub> は存在しない。X が単結合である場合、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は存在せず、X' が単結合である場合、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は存在しない) であり、

R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は、同一または異なって、

( i ) 水素原子、またはハロゲン原子；

( i i ) 1 価の炭化水素基；

( i i i ) アラルキル；

( i v ) 1 価の複素環基；

( v ) R<sub>c</sub> - O -、R<sub>c</sub> - C ( = O ) -、R<sub>c</sub> - O - C ( = O ) -、もしくは R<sub>c</sub> - C ( = O ) - O - ( R<sub>c</sub> は、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。 ) ；

( v i ) N R<sub>d</sub> R<sub>e</sub> -、N R<sub>d</sub> R<sub>e</sub> - C ( = O ) -、N R<sub>d</sub> R<sub>e</sub> - C ( = O ) - O -、もしくは R<sub>d</sub> - C ( = O ) - N R<sub>e</sub> - ( R<sub>d</sub> および R<sub>e</sub> は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。 ) ；または

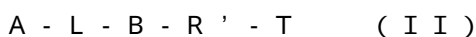
( v i i ) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、もしくはカルボキシル基からなる群より選ばれ、

Y および Y' は、同一または異なって、〔 2 4 〕 記載の式 ( B - 1 ) の Y と同じであり、

Z および Z' は、同一または異なって、前記式 ( B - 1 ) の Z と同じである。〕で表される、〔 5 9 〕 の抗体またはその塩。

40

〔 6 1 〕 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩であって、下記式 ( I I ) :



〔 式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、抗体と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成す

50

る部分であり、

Tは、抗体である。)表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、抗体またはその塩。

【0014】

(抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の製造方法)

〔62〕抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

下記式(I)：

A - L - B - R (I)

10

〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記抗体に対する反応性基である。)で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を、抗体と反応させて、

下記式(II)：

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

20

〔式中、

A、L、およびBは、前記式(I)のものと同じであり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。)で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

〔63〕反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔62〕の方法。

【0015】

第3に、本発明は、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩、およびその製造方法を提供する。

30

(抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩)

〔64〕抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩であって、

下記式(III)：

A - L - B'(-F) - R' - T (III)

〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

40

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。)で表されるものであり、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、複合体またはその塩。

〔65〕抗体がモノクローナル抗体である、〔64〕の複合体またはその塩。

〔66〕抗体がIgG抗体である、〔64〕または〔65〕の複合体またはその塩。

〔67〕抗体がヒト由来である、〔64〕~〔66〕のいずれかの複合体またはその塩。

50

〔 6 8 〕抗体が、下記（ A ）～（ C ）からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、〔 6 4 〕～〔 6 7 〕のいずれかの複合体またはその塩：

（ A ）配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；

（ B ）配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；または

（ C ）配列番号 1 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

〔 6 9 〕抗体が、連続する 1 ～ 5 0 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定の

10

アミノ酸残基を 5 個以上含み、  
A - L - B ' ( - F ) - R ' で表される構造単位が、前記標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 3 0 % 以上の位置選択性で結合している、〔 6 4 〕～〔 6 8 〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔 7 0 〕前記特定のアミノ酸残基が、特定の位置に存在する特定のアミノ酸を中心としてそれぞれ N 末端側および C 末端側に対して a 個（ここで、a は、1 ～ 1 0 の任意の整数である）のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、前記特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まない、〔 6 9 〕の複合体またはその塩。

〔 7 1 〕前記抗体が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

20

T が、複数個の重鎖中の対応する複数個の標的領域において、A - L - B ' ( - F ) - R ' で表される構造単位を有する結果、前記抗体が A - L - B ' ( - F ) - R ' で表される構造単位を複数個有する、〔 6 4 〕～〔 7 0 〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔 7 2 〕前記機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有する場合、または、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有するように誘導体化されている場合、前記生体直交性官能基と反応し易い官能基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン

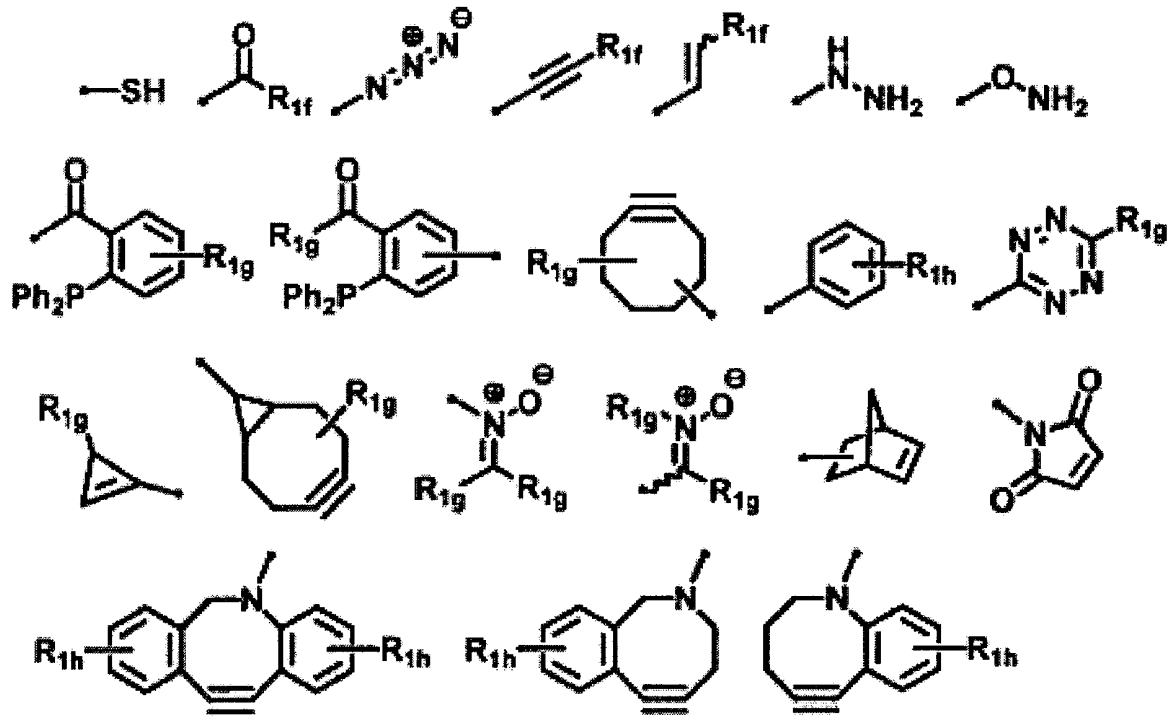
30

残基からなる群より選ばれる基である、〔 6 4 〕～〔 7 1 〕のいずれかの複合体またはその塩。  
〔 7 3 〕前記機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有する場合、または、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有するように誘導体化されている場合、前記生体直交性官能基と反応し易い官能基が、下記：

40

50

## 【化 1 2】



10

20

〔式中、

R<sub>1f</sub>、単一もしくは複数の R<sub>1g</sub> および単一もしくは複数の R<sub>1h</sub> は、同一もしくは異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、・は、機能的物質に対する結合手である。) で表される基からなる群より選ばれる基である、〔64〕~〔71〕のいずれかの複合体またはその塩。

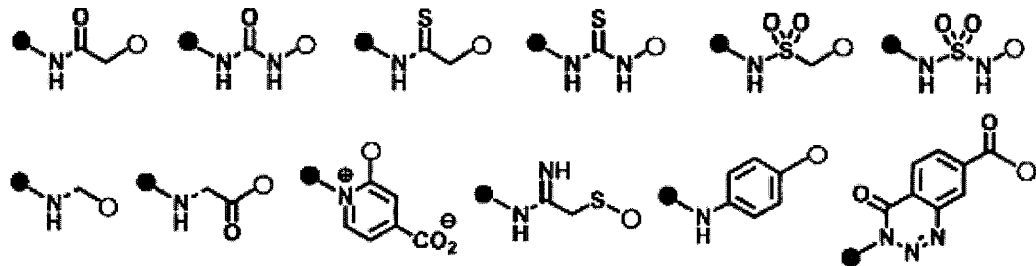
〔74〕抗体と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基と、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分である、〔64〕~〔73〕のいずれかの複合体またはその塩。

30

〔75〕抗体と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分である、〔64〕~〔74〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔76〕前記反応により生成する部分が、下記：

## 【化 1 3】



40

〔ここで、(黒丸)は、T側の部分に対する結合を示し、(白丸)は、B側の部分に対する結合を示す。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔64〕~〔75〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔77〕機能的物質が薬物または標識物質である、〔64〕~〔76〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔78〕機能的物質が低分子化合物である、〔64〕~〔77〕のいずれかの複合体またはその塩。

50

〔 7 9 〕 薬物が抗癌剤である、〔 7 7 〕 または〔 7 8 〕 の複合体またはその塩。

〔 8 0 〕 A および R ' を連結する主鎖の原子数が 4 ~ 2 0 個である、〔 6 4 〕 ~ 〔 7 9 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 1 〕 A および R を連結する主鎖が環構造を含まない、〔 6 4 〕 ~ 〔 8 0 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 2 〕 L - B で表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔 6 4 〕 ~ 〔 8 1 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 3 〕 前記式 ( I I I ) で表される化合物が、下記式 ( I I I ' ) :



〔 式中、

A、R' および T は、前記式 ( I I ) のものと同じであり、

L' は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

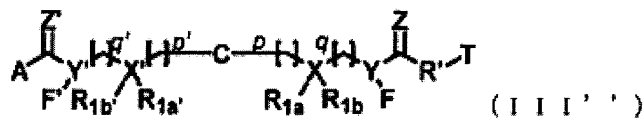
B 1' および B 2' は、同一または異なって、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F 1 および F 2 は、同一または異なって、機能性物質であり、

B 1' ( - F 1 ) および B 2' ( - F 2 ) は、L' を中心にした対称構造を有していてもよい。〕で表される、〔 6 4 〕 ~ 〔 8 2 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 4 〕 前記式 ( I I I ' ) で表される化合物が、下記 ( I I I ' ' ) :

〔 化 1 4 〕



〔 式中、

A、R' および T は、〔 6 2 〕 記載の式 ( I I I ) のものと同じであり、

C は、切断性部分であり、

p および p' は、同一または異なって、0 ~ 1 0 の任意の整数であり、

q および q' は、同一または異なって、0 ~ 1 0 の任意の整数であり、

X および X' は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合 (ここで、X が窒素原子である場合、R<sub>1b</sub> は存在せず、X' が窒素原子である場合、R<sub>1b</sub> は存在しない。X が単結合である場合、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は存在せず、X' が単結合である場合、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は存在しない) であり、

R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は、同一または異なって、前記 ( i ) ~ ( v i i ) からなる群より選ばれ、

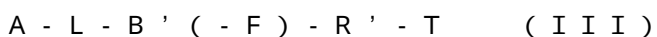
Y および Y' は、同一または異なって、前記式 ( B - 1 ) の Y から水素原子を一つ除いた残基であり、

Z および Z' は、同一または異なって、前記式 ( B - 1 ) の Z と同じであり、

F および F' は、同一または異なって、機能性物質である。〕で表される、〔 8 3 〕 の複合体またはその塩。

〔 8 5 〕 親和性物質、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩であって、

下記式 ( I I I ) :



〔 式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F は、機能性物質であり、

R' は、抗体と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

10

20

30

40

50



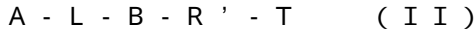
Tは、抗体である。)で表されるものであり、かつ  
抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、複合体またはその塩。

【0016】

(抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の製造方法)

〔86〕抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の製造方法であって、

下記式(I I)：



10

〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

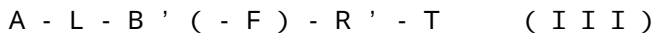
Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。)で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式(I I I)：



20

〔式中、

A、L、R'およびTは、前記式(I I)のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

Fは、機能性物質である。)で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成することを含み、かつ

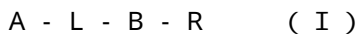
抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

〔87〕反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔86〕の方法。

〔88〕抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の製造方法であって、

30

(A)下記式(I)：



〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

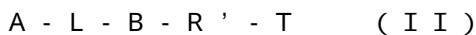
Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基であり、

Rは、前記抗体に対する反応性基である。)で表される化合物またはその塩を、抗体と反応させて、

下記式(I I)：

40



〔式中、

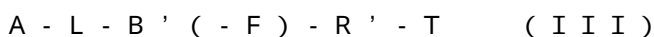
A、L、およびBは、前記式(I)のものと同じであり

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。)で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を生成すること、ならびに

(B)前記抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式(I I I)：



50

〔式中、

AおよびLは、前記式(I)のものと同じであり、

R'およびTは、前記式(II)のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

Fは、機能性物質である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

【0017】

第4に、本発明は、生体直交性官能基を有する抗体の製造方法を提供する。

〔89〕生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

下記式(II)：

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

〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(IV)：

L1-B-R'-T (IV)

〔式中、

B、R'およびTは、前記式(II)のものと同じであり、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

〔90〕Lが、(i)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2価の基である切断性リンカー、または(ii)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーである、〔89〕の方法。

〔91〕Lが前記(i)の切断性リンカーであり、

L1が、(i')生体直交性官能基を含む1価の基であり、

Bが、前記(a)または(b)の2価の基である、〔89〕の方法。

〔92〕Lが前記(i)の切断性リンカーであり、

L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基であり、

Bが前記(b)の2価の基である、〔90〕または〔91〕の方法。

〔93〕Lが前記(ii)の切断性リンカーであり、

L1が(i')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bが前記(a)の2価の基である、〔90〕の方法。

〔94〕反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔89〕~〔93〕のいずれかの方法。

〔95〕生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

(A)下記式(I)：

A-L-B-R (I)

〔式中、

10

20

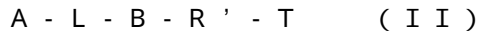
30

40

50

A は、抗体に対する親和性物質であり、  
 L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、  
 B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、  
 R は、前記抗体に対する反応性基である。〕で表される化合物またはその塩を、抗体と反応させて、

下記式 ( I I ) :



〔式中、

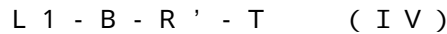
A、L、および B は、前記式 ( I ) のものと同じであり

R' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を生成すること、ならびに

( B ) 前記抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 ( I V ) :



〔式中、

B、R' および T は、前記式 ( I I ) のものと同じであり、

L 1 は、( i' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

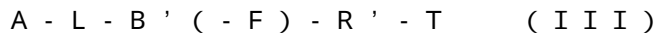
抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

【 0 0 1 8 】

第 5 に、本発明は、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する。

〔 9 6 〕 機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

下記式 ( I I I ) :



〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F は、機能性物質であり、

R' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 ( V ) :



〔式中、

L 1 は、( i' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

( L 1 - B )' で表される構造単位は、機能性物質と、( i' ) および ( a ) における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む 2 価の構造単位であり、

F は、機能性物質であり、

R' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

10

20

30

40

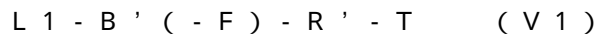
50

Tは、抗体である。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

〔 9 7 〕前記抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 ( V 1 ) :



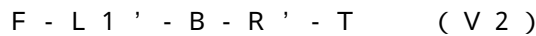
〔式中、

L 1 は、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B'、F、R' および T は、前記式 ( I I I ) のものと同じである。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み方法である、〔 9 6 〕の方法。

〔 9 8 〕前記生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を、1 種または 2 種の機能性物質と反応させて、

下記式 ( V 2 ) :



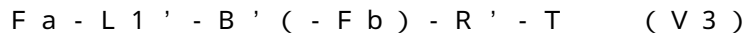
〔式中、

B、R' および T は、前記式 ( I V ) のものと同じであり、

L 1' は、機能性物質と、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。〕、または

下記式 ( V 3 ) :



〔式中、

R' および T は、前記式 ( I V ) のものと同じであり、

L 1' は、前記式 ( V 2 ) のものと同じであり、

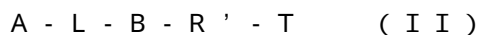
B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み方法である、〔 9 6 〕の方法。

〔 9 9 〕反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔 9 6 〕 ~ 〔 9 8 〕のいずれかの方法。

〔 1 0 0 〕機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

( A ) 下記式 ( I I ) :



〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

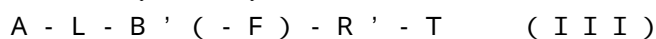
L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

R' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式 ( I I I ) :



〔式中、

A、L、R' および T は、前記式 ( I I ) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F は、機能性物質である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能

10

20

30

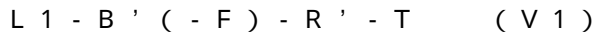
40

50

性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(V1)：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'、F、R'およびTは、前記式(III)のものと同じである。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

〔101〕機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式(I)：



〔式中、

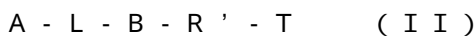
Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基であり、

Rは、前記抗体に対する反応性基である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を、抗体と反応させて、

下記式(II)：



〔式中、

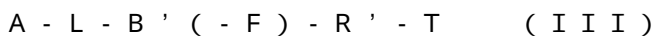
A、L、およびBは、前記式(I)のものと同じであり

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を生成すること、

(B) 前記抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式(III)：



〔式中、

AおよびLは、前記式(I)のものと同じであり、

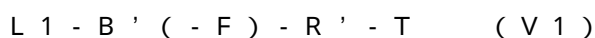
R'およびTは、前記式(II)のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

Fは、機能性物質である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

(C) 前記抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(V1)：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'、F、R'およびTは、前記式(III)のものと同じである。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

10

20

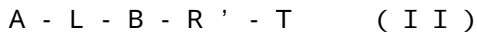
30

40

50

〔 1 0 2 〕 機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

( A ) 下記式 ( I I ) :



〔 式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 ( I V ) :



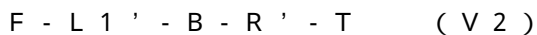
〔 式中、

B、R' および T は、前記式 ( I I ) のものと同じであり、

L 1 は、( i' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること、ならびに

( B ) 前記生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を、1 種または 2 種以上の機能性物質と反応させて、

下記式 ( V 2 )



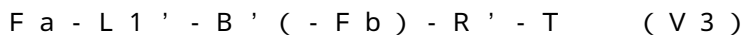
〔 式中、

B、R' および T は、前記式 ( I V ) のものと同じであり、

L 1' は、機能性物質と、( i' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。〕、または

下記式 ( V 3 ) :



〔 式中、

R' および T は、前記式 ( I V ) のものと同じであり、

L 1' は、前記式 ( V 2 ) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

〔 1 0 3 〕 機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法であって、

( A ) 下記式 ( I ) :



〔 式中、

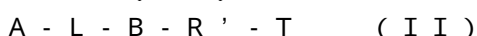
A は、抗体に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、前記抗体に対する反応性基である。〕で表される化合物またはその塩を、抗体と反応させて、

下記式 ( I I ) :



10

20

30

40

50

〔式中、

A、L、およびBは、前記式(I)のものと同じであり

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩を生成すること、

(B)前記抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(IV)：



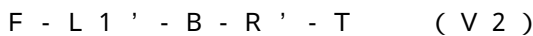
〔式中、

B、R'およびTは、前記式(II)のものと同じであり、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること、ならびに

(C)前記生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を、1種または2種以上の機能性物質と反応させて、

下記式(V2)



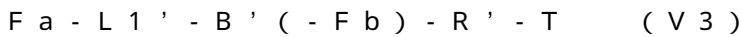
〔式中、

B、R'およびTは、前記式(IV)のものと同じであり、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質である。〕、または

下記式(V3)：



〔式中、

R'およびTは、前記式(IV)のものと同じであり、

L1'は、前記式(V2)のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

FaおよびFbは、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。〕で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成することを含み、かつ

抗体に対する親和性物質が、上記式1-1~1-9、および式2-1のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである、方法。

【発明の効果】

【0019】

(I)抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する本発明の化合物またはその塩は、例えば、抗体の位置選択的な修飾に有用である。

(I)本発明の化合物またはその塩、(II)抗体に対する親和性物質、および切断性部分を(位置選択的に)有する本発明の抗体またはその塩、(III)抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を(位置選択的に)有する本発明の複合体またはその塩は、例えば、生体直交性官能基を(位置選択的に)有する抗体またはその塩、および機能性物質を(位置選択的に)有する抗体またはその塩の調製のための中間体として有用である。機能性物質を(位置選択的に)有する抗体またはその塩は、例えば、医薬、または試薬(例、診断薬、研究用試薬)として有用である。生体直交性官能基を(位置選択的に)有する抗体またはその塩は、機能性物質を(位置選択的に)有する抗体またはその塩の調製のための中間体として有用である。したがって、(I)本発明の化合物またはその塩、(II)本発明の抗体またはその塩、および(III)本発明の複合体またはその塩は、例えば、医薬、または試薬の合成中間体として有用である。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

【図 1 - 1】図 1 - 1 は、本発明の化合物〔抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物：A - L - B - R ( I ) 〕による抗体の位置選択的修飾のコンセプトを示す模式図 ( その 1 ) である。先ず、本発明の化合物は、抗体に対する親和性物質 ( A ) を介して、抗体 ( T ) に会合する。次に、本発明の化合物は、反応性基 ( R ) ( 図中では活性化エステル ) を介して、親和性物質と抗体との会合部位の近傍に存在する標的領域中の特定のアミノ酸残基の側鎖 ( 図中ではリジン残基の側鎖 ) と反応して、本発明の化合物と抗体とのコンジュゲート〔抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む構造単位を位置選択的に有する抗体：A - L - B - R ' - T ( I I ) 〕を生成する。

【図 1 - 2】図 1 - 2 は、本発明の化合物による抗体の位置選択的修飾のコンセプトを示す模式図 ( その 2 ) である。リンカー ( L ) 中の切断性部分の切断により、生体直交性官能基で位置特異的に修飾された抗体が生成する。

10

【図 1 - 3】図 1 - 3 は、本発明の化合物による抗体の位置選択的修飾のコンセプトを示す模式図 ( その 3 ) である。生体直交性官能基と機能性物質 ( 例、薬物 ) との反応により、機能性物質で位置特異的に修飾された抗体が生成する。

【図 2】図 2 は、本発明の各発明の関連性を示す図である ( 塩については表記を省略 ) 。反応 ( 1 ) では、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物を抗体と反応させて、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体を生成する。反応 ( 2 ) では、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体を機能性物質と反応させて、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体を生成する。反応 ( 3 ) では、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体の切断性部分を切断して、機能性物質を有する抗体を生成する ( このとき、親和性物質の含有部分が副産物として生成する ) 。反応 ( 4 ) では、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する抗体を生成する ( このとき、親和性物質の含有部分が副産物として生成する ) 。反応 ( 5 ) では、生体直交性官能基を有する抗体を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する抗体を生成する。反応 ( 2 ) および ( 5 ) は同様に行うことができる。反応 ( 3 ) および ( 5 ) もまた、同様に行うことができる。

20

【図 3】図 3 は、トラスツズマブの重鎖中の F c 領域、および I g G 1 F c 領域のコンセンサスアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) を示す図である。

30

【図 4】図 4 は、( 1 ) トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) 、( 2 ) 糖鎖を PNGase で切断した I g G 1 F c 領域のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 ) 、および ( 3 ) トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列 ( 配列番号 4 ) を示す図である。

【図 5】図 5 は、トラスツズマブの特異的修飾の H I C ( H y d r o p h o b i c I n t e r a c t i o n C h r o m a t o g r a p h y ( 疎水性相互作用クロマトグラフィー ) ) - U P L C 解析の結果 ( 検出波長：U V 2 8 0 n m ) を示す図である ( 実施例 1 ) 。縦軸の A U は、吸光度を示す ( 以降の図面において同様 ) 。

【図 6】図 6 は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 ( ヨードアセトアミドによる C a r b a m i d o m e t h y l 化を受けたチオール導入体 ( + 1 4 5 . 0 1 9 D a ) ) を含むアミノ酸 3 3 残基からなるペプチド、T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R ( 配列番号 6 ) のペプチドフラグメントの M S スペクトル ( 実測値：m / z 1 2 6 9 . 3 0 7 1 7 、理論値：1 2 6 9 . 3 0 2 7 3 、3 価 ) を示す図である ( 実施例 2 ) 。

40

【図 7 - 1】図 7 - 1 は、E U n u m b e r i n g におけるヒト I g G 重鎖の 2 4 8 位のリジン残基の修飾を示す、2 価の y 9 に相当する m / z 6 0 3 . 2 9 ( 理論値：6 0 3 . 3 0 ) のプロダクトイオンの C I D スペクトルを示す図である ( 実施例 2 ) 。

【図 7 - 2】図 7 - 2 は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾 ( ヨードアセトアミドによる C a r b a m i d o m e t h y l 化を受けたチオール導入体 ( + 1 4 5 . 0 1 9 D a ) を含むペプチドフラグメントを P r o t e o m e D i s c o v e r e r ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) を用いて検索した結果を示

50



す図である（実施例 2）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸は Peptide Spectrum Matches (PSMs) を示す。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖 VH ドメインおよび軽鎖上については配列中の番号（すなわち、N 末のアミノ酸を 1 番目とする。以下同様）で、重鎖 CH1、CH2、CH3 ドメイン上については EU numbering を用いて表記した。

【図 8】図 8 は、トラスツズマブの Glu-C プロテアーゼ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによる Carbamidomethyl 化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)）を含むアミノ酸 16 残基からなるペプチド、LLGGPSVFLFPPKPKD（配列番号 7）のペプチドフラグメントの MS スペクトル（実測値：m/z 619.67299、理論値：619.67112、3 価）を示す図である（実施例 2）。

10

【図 9 - 1】図 9 - 1 は、EU numbering におけるヒト IgG 重鎖の 246 位もしくは 248 位のリジン残基の修飾を示す、1 価の y5 に相当する m/z 729.49（理論値：729.36）のプロダクトイオンの CID スペクトルを示す図である（実施例 2）。

【図 9 - 2】図 9 - 2 は、トラスツズマブの Glu-C プロテアーゼ消化物に対し、リジン残基への修飾（ヨードアセトアミドによる Carbamidomethyl 化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)）を含むペプチドフラグメントを Proteome Discoverer（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて検索した結果を示す図である（実施例 2）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸は Peptide Spectrum Matches (PSMs) を示す。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖 VH ドメインおよび軽鎖上については配列中の番号で、重鎖 CH1、CH2、CH3 ドメイン上については EU numbering を用いて表記した。

20

【図 10】図 10 は、トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析の結果（検出波長：UV 280 nm）を示す図である（実施例 3）。

【図 11】図 11 は、トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析の結果（検出波長：UV 280 nm）を示す図である（実施例 4）。

【図 12】図 12 は、トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析の結果（検出波長：UV 280 nm）を示す図である（実施例 5）。

【図 13】図 13 は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによる Carbamidomethyl 化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)）を含むアミノ酸 33 残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISR（配列番号 6）のペプチドフラグメントの MS スペクトル（実測値：m/z 952.23170、理論値：952.22900、4 価）を示す図である（実施例 6）。

30

【図 14 - 1】図 14 - 1 は、EU numbering におけるヒト IgG 重鎖の 246 位もしくは 248 位のリジン残基の修飾を示す、2 価の y20 に相当する m/z 1166.88（理論値：1166.61）のプロダクトイオンの CID スペクトルを示す図である（実施例 6）。

【図 14 - 2】図 14 - 2 は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾（ヨードアセトアミドによる Carbamidomethyl 化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)）を含むペプチドフラグメントを Proteome Discoverer（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて検索した結果を示す図である（実施例 6）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸は Peptide Spectrum Matches (PSMs) を示す。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖 VH ドメインおよび軽鎖上については配列中の番号で、重鎖 CH1、CH2、CH3 ドメイン上については EU numbering を用いて表記した。

40

【図 15】図 15 は、トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析の結果（検出波長：UV 280 nm）を示す図である（実施例 7）。

【図 16】図 16 は、トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析の結果（検出

50

波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例8)。

【図17】図17は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例9)。

【図18】図18は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例10)。

【図19】図19は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例11)。

【図20】図20は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例12)。

【図21】図21は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例13)。

10

【図22】図22は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例14)。

【図23】図23は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例15)。

【図24】図24は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例16)。

【図25】図25は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例17)。

【図26】図26は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例18)。

20

【図27】図27は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例19)。

【図28】図28は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例20)。

【図29】図29は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例21)。

【図30】図30は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例22)。

【図31】図31は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例23)。

30

【図32】図32は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例24)。

【図33】図33は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例25)。

【図34】図34は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例26)。

【図35】図35は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例27)。

【図36】図36は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例28)。

40

【図37】図37は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例29)。

【図38】図38は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例30)。

【図39】図39は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例31)。

【図40】図40は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例32)。

【図41】図41は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出

50

波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例33)。

【図42】図42は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例34)。

【図43】図43は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例35)。

【図44】図44は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例36)。

【図45】図45は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例37)。

【図46】図46は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例38)。

10

【図47】図47は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例39)。

【図48】図48は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例40)。

【図49】図49は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例41)。

【図50】図50は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例42)。

【図51】図51は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例43)。

20

【図52】図52は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例44)。

【図53】図53は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例45)。

【図54】図54は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例46)。

【図55】図55は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例47)。

【図56】図56は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例48)。

30

【図57】図57は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例49)。

【図58】図58は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例50)。

【図59】図59は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例51)。

【図60】図60は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例52)。

【図61】図61は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例53)。

40

【図62】図62は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例54)。

【図63】図63は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例55)。

【図64】図64は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例56)。

【図65】図65は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例57)。

【図66】図66は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出

50

波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例58)。

【図67】図67は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例59)。

【図68】図68は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例60)。

【図69】図69は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例61)。

【図70】図70は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例62)。

【図71】図71は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例63)。

10

【図72】図72は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例64)。

【図73】図73は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例65)。

【図74】図74は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例66)。

【図75】図75は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例67)。

【図76】図76は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例68)。

20

【図77】図77は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例69)。

【図78】図78は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例70)。

【図79】図79は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例71)。

【図80】図80は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例72)。

【図81】図81は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例73)。

30

【図82】図82は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例74)。

【図83】図83は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例75)。

【図84】図84は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例76)。

【図85】図85は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例77)。

【図86】図86は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例78)。

40

【図87】図87は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例79)。

【図88】図88は、トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例80)。

【図89】図89は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例80)。

【図90】図90は、トラスツズマブ・チオール導入体の特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例80)。

【図91】図91は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出

50

波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例80)。

【図92】図92は、トラスツズマブ蛍光標識体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例80)。

【図93】図93は、ADC mimicの還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例80)。

【図94】図94は、実施例80の結果のまとめを示す図である。

【図95】図95は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例81)。

【図96】図96は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019 Da))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値： $m/z$  1269.30359、理論値：1269.30273、3価)を示す図である(実施例81)。

【図97-1】図97-1は、EU numberingにおけるヒトIgG重鎖の246位もしくは248位のリジン残基の修飾を示す、1価のy9に相当する $m/z$  1205.86(理論値：1205.60)のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である(実施例81)。

【図97-2】図97-2は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019 Da))を含むペプチドフラグメントをProteome Discoverer(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いて検索した結果を示す図である(実施例81)。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸はPeptide Spectrum Matches(PSMs)を示す。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖VHドメインおよび軽鎖上については配列中の番号で、重鎖CH1、CH2、CH3ドメイン上についてはEU numberingを用いて表記した。

【図98】図98は、抗体-核酸コンジュゲートのSDS-PAGEによる分析結果を示す図である(実施例82)。

【図99】図99は、トラスツズマブ・アジド導入体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例83)。

【図100】図100は、ADC mimicの還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例83)。

【図101】図101は、トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例84)。

【図102】図102は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例84)。

【図103】図103は、トラスツズマブ・アジド導入体の特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である(実施例84)。

【図104】図104は、トラスツズマブ・アジド導入体の特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果(検出波長：UV 280 nm)を示す図である(実施例84)。

【図105】図105は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(アジドカルボン酸導入体(+240.086))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値： $m/z$  1300.99241、理論値：1300.99173、3価)を示す図である(実施例84)。

【図106-1】図106-1は、EU numberingにおける246位もしくは248位のリジン残基の修飾を示す、1価のy12に相当する $m/z$  1622.92(理論値：1622.87)のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である(実施例84)。

【図106-2】図106-2は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残

10

20

30

40

50

基への修飾（アジド導入体（+255.097 Da）、アミン導入体（+229.106）、アジドカルボン酸導入体（+240.086）、アミンカルボン酸導入体（+214.095））を含むペプチドフラグメントを Proteome Discoverer（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて検索した結果を示す図である（実施例84）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸は Peptide Spectrum Matches (PSMs) を示す。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖 V Hドメインおよび軽鎖上については配列中の番号で、重鎖 CH1、CH2、CH3ドメイン上については EU numbering を用いて表記した。

【図107】図107は、ADC mimicの還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認を示す図である（実施例85）。

10

【図108】図108は、トラスツズマブ・アジド導入体の特異的修飾のHIC-UPLC解析（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例85）。

【図109】図109は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（DBCO-Acidカルボン酸導入体（+559.207））を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR（配列番号6）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値： $m/z$  1055.77631、理論値：1055.77600、4価）を示す図である（実施例85）。

【図110-1】図110-1は、EU numberingにおける246位もしくは248位のリジン残基の修飾を示す、2価の $y_{12}$ に相当する $m/z$  971.71（理論値：971.50）のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である（実施例85）。

20

【図110-2】図110-2は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾（DBCO-Acid導入体（+574.218）、DBCO-Acidカルボン酸導入体（+559.207）、アジド導入体（+255.097）、アジドカルボン酸導入体（+240.086））を含むペプチドフラグメントを Proteome Discoverer（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて検索した結果を示す図である（実施例85）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸は Peptide Spectrum Matches (PSMs) を示す。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖 V Hドメインおよび軽鎖上については配列中の番号で、重鎖 CH1、CH2、CH3ドメイン上については EU numbering を用いて表記した。

30

【図111】図111は、抗TNF-IgG1抗体アダリムマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析を示す図である（実施例86）。

【図112】図112は、アダリムマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例86）。

【図113】図113は、アダリムマブ・ペプチド複合体のリンカー切断を示す図である（実施例86）。

【図114】図114は、アダリムマブ・チオール導入体のHIC-UPLC解析（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例86）。

【図115】図115は、アダリムマブ・チオール導入体への蛍光標識を示す図である（実施例86）。

40

【図116】図116は、抗RANKL-IgG2抗体デノスマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析を示す図である（実施例87）。

【図117】図117は、デノスマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例87）。

【図118】図118は、デノスマブ・ペプチド複合体のリンカー切断を示す図である（実施例87）。

【図119】図119は、デノスマブ・チオール導入体のHIC-UPLC解析（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例87）。

【図120】図120は、デノスマブ・チオール導入体への蛍光標識を示す図である（実

50

施例 87)。

【図 121】図 121 は、抗 IL-4 / 13 受容体 IgG4 抗体デュピルマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析を示す図である (実施例 88)。

【図 122】図 122 は、デュピルマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析 (検出波長: UV 280 nm) を示す図である (実施例 88)。

【図 123】図 123 は、デュピルマブ・ペプチド複合体のリンカー切断を示す図である (実施例 88)。

【図 124】図 124 は、デュピルマブ・チオール導入体の HIC-UPLC 解析 (検出波長: UV 280 nm) を示す図である (実施例 88)。

【図 125】図 125 は、デュピルマブ蛍光標識体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認を示す図である (実施例 88)。

10

【発明を実施するための形態】

【0021】

1. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩

1-1. 概要

本発明は、式 (I) で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を提供する。

A-L-B-R (I)

[式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、

20

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、前記抗体に対する反応性基である。]

【0022】

本発明に関連して提示される式 (I) および他の式において、- (ハイフン) は、その両側に存在する 2 つの単位が共有結合していることを示す。したがって、式 (I) では、A は、L と共有結合しており、L は、A および B と共有結合しており、B は、L および R と共有結合しており、R は、B と共有結合している。

【0023】

30

1-2. 抗体に対する親和性物質 (A)

式 (I) において、A は、抗体に対する親和性物質である。親和性物質とは、抗体に対して非共有結合による結合能を有する物質である。

【0024】

本発明で用いられる親和性物質は、抗体を標的とする。抗体は、生体分子 (例、糖) で修飾されたタンパク質 (例、糖タンパク質) であっても、生体分子で未修飾のタンパク質であってもよい。抗体としては、生物由来成分、ウイルス由来成分、および環境に見出される成分等の任意の成分に対する任意の抗体を用いることができるが、生物由来成分またはウイルス由来成分に対する抗体が好ましい。生物由来成分としては、例えば、哺乳動物、鳥類 (例、ニワトリ) 等の動物、昆虫、微生物、植物、菌類、および魚類由来の成分 (例、タンパク質) が挙げられる。好ましくは、生物由来成分は、哺乳動物由来の成分である。哺乳動物としては、例えば、霊長類 (例、ヒト、サル、チンパンジー)、齧歯類 (例、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ)、愛玩動物 (例、イヌ、ネコ)、家畜 (例、ウシ、ブタ、ヤギ)、使役動物 (例、ウマ、ヒツジ) が挙げられる。生物由来成分は、より好ましくは、霊長類または齧歯類由来の成分 (例、タンパク質) であり、さらにより好ましくは、本発明の臨床応用の観点から、ヒト由来の成分 (例、タンパク質) である。ウイルス由来成分としては、例えば、インフルエンザウイルス (例、トリインフルエンザウイルス、ブタインフルエンザウイルス)、エイズウイルス、エボラウイルス、ファージウイルスに由来する成分 (例、タンパク質) が挙げられる。

40

【0025】

50

抗体はまた、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、好ましくはモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、所定の糖鎖が付加された抗体（例、N型糖鎖結合コンセンサス配列等の糖鎖結合コンセンサス配列を有するように改変された抗体）、二重特異性抗体、s c F v抗体、F a b抗体、F ( a b ' )<sub>2</sub>抗体、V H H抗体、F c領域タンパク質、F c融合タンパク質が挙げられる。抗体はまた、2価の抗体（例、I g G、I g D、I g E）、または4価以上の抗体（例、I g A抗体、I g M抗体）であってもよい。

#### 【0026】

親和性物質の標的である抗体はまた、任意のアミノ酸残基から構成されていてもよいが、好ましくは、タンパク質を通常構成する天然の20種のL-アミノ酸残基から構成される。このようなアミノ酸残基としては、例えば、L-アラニン(A)、L-アスパラギン(N)、L-システイン(C)、L-グルタミン(Q)、L-イソロイシン(I)、L-ロイシン(L)、L-メチオニン(M)、L-フェニルアラニン(F)、L-プロリン(P)、L-セリン(S)、L-スレオニン(T)、L-トリプトファン(W)、L-チロシン(Y)、L-バリン(V)、L-アスパラギン酸(D)、L-グルタミン酸(E)、L-アルギニン(R)、L-ヒスチジン(H)、またはL-リジン(K)、及びグリシン(G)が挙げられる（以下、Lの表記を省略）。抗体は、例えば100個以上、好ましくは120個以上、より好ましくは150個以上、さらにより好ましくは180個以上、特に好ましくは200個以上のアミノ酸残基から構成されていてもよい。抗体はまた、例えば1000個以下、好ましくは900個以下、より好ましくは800個以下、さらにより好ましくは700個以下、特に好ましくは600個以下であってもよい。より具体的には、抗体は、例えば100~1000個、好ましくは120~900個、より好ましくは150~800個、さらにより好ましくは180~700個以上、特に好ましくは200~600個のアミノ酸残基から構成されていてもよい。抗体が抗体（例、上述したようなモノクローナル抗体）である場合、上記個数のアミノ酸残基は、抗体の重鎖のアミノ酸残基に相当するものであってもよい。

#### 【0027】

親和性物質の標的である抗体はさらに、後述するような反応性基が反応できる側鎖または末端（N末端および/またはC末端）、好ましくは側鎖を有する特定のアミノ酸残基を1つの位置または複数の位置（好ましくは複数の位置）で含むタンパク質である。このような特定のアミノ酸残基としては、例えば、後述するような14種のアミノ酸残基が挙げられるが、好ましくは、リジン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、およびシステイン残基からなる群より選ばれるアミノ酸残基である。本発明の化合物が抗体を位置選択的に修飾できることに鑑みると、このような特定のアミノ酸残基を複数の位置で含む抗体が好ましい。複数の位置としては、2以上の位置である限り特に限定されないが、例えば3以上の位置、好ましくは5以上の位置、より好ましくは10以上の位置、さらにより好ましくは20以上の位置、特に好ましくは30以上の位置であってもよい。複数の位置はまた、例えば200以下の位置、好ましくは180以下の位置、より好ましくは150以下の位置、さらにより好ましくは120以下の位置、特に好ましくは100以下の位置であってもよい。より具体的には、複数の位置は、例えば3~200の位置、好ましくは5~180の位置、より好ましくは10~150の位置、さらにより好ましくは20~120の位置、特に好ましくは30~100の位置であってもよい。このような特定のアミノ酸残基を複数の位置で含む抗体であっても、本発明の化合物は、特定の一の位置に存在する特定のアミノ酸残基を位置選択的に修飾することができる。例えば、ヒトI g G 1のリジン残基数は、可変領域中のアミノ酸組成にもよるが、一般的には70~90個程度と言われている。本発明では、このようなヒトI g G 1の特定の位置に存在するリジン残基を位置選択的に修飾することに成功している。

#### 【0028】

より具体的には、本発明では、抗体の機能を維持しつつ（すなわち、抗体を変性させずにネイティブなフォールディングを維持しつつ）、抗体中の特定の位置に存在するアミノ

10

20

30

40

50



酸残基を修飾する観点から、抗体の表面に露出しているアミノ酸残基の位置選択的な修飾が好ましい。例えば、ヒトIgG1等のヒトIgGでは、露出リジン残基および露出チロシン残基は、以下の位置に存在する(EU numberingによる; [http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IgHGnumber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHGnumber.html)を参照)。なお、本願においては、説明上の便宜のため、重鎖CH1、CH2、CH3ドメイン上についてはEU numberingを用いて表記し、重鎖VHドメインおよび軽鎖上については配列中の番号(すなわち、N末端のアミノ酸を1番目)を用いて表記することがある。

(1) 露出リジン残基

CH2ドメイン(246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位、338位)

10

CH3ドメイン(360位、414位、439位)

(2) 露出チロシン残基

CH2ドメイン(278位、296位、300位)

CH3ドメイン(436位)

したがって、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基またはチロシン残基で修飾される場合、上記位置での修飾が好ましい。

【0029】

好ましくは、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基またはチロシン残基で修飾される場合、上記(1)および(2)の位置のなかでも、表面への露出性が高い以下の位置に存在するリジン残基またはチロシン残基が修飾されてもよい。

20

(1') 露出リジン残基

CH2ドメイン(246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位)

CH3ドメイン(360位、414位、439位)

(2') 露出チロシン残基

CH2ドメイン(278位、296位、300位)

CH3ドメイン(436位)

したがって、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基またはチロシン残基で修飾される場合、上記位置での修飾がより好ましい。

30

【0030】

より好ましくは、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基で修飾される場合、上記(1)の位置のなかでも、本発明において効率的に修飾することができるCH2ドメイン中の所定の位置(例、246位、248位、288位、290位、317位)に存在するリジン残基が修飾されてもよい。

【0031】

特定の実施形態では、親和性物質の標的である抗体は、上述したように特定のアミノ酸残基を複数の位置で含む場合、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において特定のアミノ酸残基を5個以上含むものであってもよい。標的領域は、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらにより好ましくは1~10個、1~5個、または1~3個(すなわち、1個、2個、もしくは3個)のアミノ酸残基からなるものであってもよい。特に好ましくは、標的領域は、特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基からなる領域であってもよい。このような特定の位置は、標的タンパク質および親和性物質の種類などによっても変動するが、例えば、抗体の定常領域中の特定領域(例、CH1、CH2、CH3)中の特定の位置であってもよく、好ましくは抗体のCH2中の位置であってもよい。より具体的には、標的領域は、ヒトIgG FcにおけるEU numberingに従う下記残基であってもよい：

40

(1) Lys248残基(以下、本明細書では単に「Lys248」とも表記し、ヒトIgG CH2領域(配列番号1)の18番目の残基に相当する)またはLys246残基

50

(以下、本明細書では単に「L y s 2 4 6」とも表記し、ヒトI g G C H 2領域(配列番号1)の16番目の残基に相当する) ;

(2) L y s 2 8 8残基(以下、本明細書では単に「L y s 2 8 8」とも表記し、ヒトI g G C H 2領域(配列番号1)の58番目の残基に相当する)またはL y s 2 9 0残基(以下、本明細書では単に「L y s 2 9 0」とも表記し、ヒトI g G C H 2領域(配列番号1)の60番目の残基に相当する) ;

(3) L y s 3 1 7残基(以下、本明細書では単に「L y s 3 1 7」とも表記し、ヒトI g G C H 2領域(配列番号1)の87番目の残基に相当する)。

#### 【0032】

本発明によれば、上記標的領域における特定のアミノ酸残基を高度に位置選択的に修飾することができる。このような位置選択性は、例えば30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらにより好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%以上であってもよい。

10

#### 【0033】

標的領域はまた、特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基が、当該特定の位置を中心としてそれぞれN末端側およびC末端側に対してa個(ここで、aは、1~10の任意の整数である)のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、当該特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まないものであってもよい。aは、好ましくは1~5の整数であり、より好ましくは1~3の整数であり、さらにより好ましくは1または2であり、特に好ましくは1である。

20

#### 【0034】

好ましい実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体等の抗体のアイソタイプとしては、例えば、I g G(例、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、I g M、I g A、I g D、I g E、およびI g Yが挙げられる。モノクローナル抗体は、全長抗体、または抗体断片(例、F(a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a b、F v、単鎖抗体)であるが、全長抗体が好ましい。

#### 【0035】

抗体は、任意の抗原に対する抗体である。例えば、このような抗原は、上述したような生物またはウイルスにおいて見出される成分であってもよい。このような抗原としてはまた、例えば、タンパク質[オリゴペプチド、ポリペプチドを含む。糖等の生体分子で修飾されたタンパク質(例、糖タンパク質)であってもよい]、糖鎖、核酸、低分子化合物が挙げられる。

30

#### 【0036】

好ましくは、抗体は、タンパク質を抗原とする抗体であってもよい。タンパク質としては、例えば、細胞膜受容体、細胞膜受容体以外の細胞膜タンパク質(例、細胞外基質タンパク質)、リガンド、可溶性受容体が挙げられる。

#### 【0037】

より具体的には、抗体の抗原であるタンパク質は、疾患標的タンパク質であってもよい。疾患標的タンパク質としては、例えば、以下が挙げられる。

40

#### 【0038】

##### (1) がん領域

P D - L 1、G D 2、P D G F R (血小板由来成長因子受容体)、C D 2 2、H E R 2、ホスファチジルセリン(P S)、E p C A M、フィブロネクチン、P D - 1、V E G F R - 2、C D 3 3、H G F、g p N M B、C D 2 7、D E C - 2 0 5、葉酸受容体、C D 3 7、C D 1 9、T r o p 2、C E A C A M 5、S 1 P、H E R 3、I G F - 1 R、D L L 4、T N T - 1 / B、C P A A s、P S M A、C D 2 0、C D 1 0 5(エンドグリン)、I C A M - 1、C D 3 0、C D 1 6 A、C D 3 8、M U C 1、E G F R、K I R 2 D L 1、2、N K G 2 A、t e n a s c i n - C、I G F (I n s u l i n - l i k e g r o w t h f a c t o r)、C T L A - 4、m e s o t h e l i n、C D 1 3 8、c

50

- Met、Ang 2、VEGF-A、CD79b、ENPD3、葉酸受容体、TEM-1、GM2、グリピカン3、macrophage inhibitory factor、CD74、Notch1、Notch2、Notch3、CD37、TLR-2、CD3、CSF-1R、FGFR2b、HLA-DR、GM-CSF、EphA3、B7-H3、CD123、gpA33、Frizzled7受容体、DLL4、VEGF、RSP O、LIV-1、SLITRK6、Nectin-4、CD70、CD40、CD19、SEMA4D(CD100)、CD25、MET、Tissue Factor、IL-8、EGFR、cMet、KIR3DL2、Bst1(CD157)、P-カドヘリン、CEA、GITR、TAM(tumor associated macrophage)、CEA、DLL4、Ang2、CD73、FGFR2、CXCR4、LAG-3、GITR、Fucosyl GM1、IGF-1、Angiopoietin 2、CSF-1R、FGFR3、OX40、BCMA、ErbB3、CD137(4-1BB)、PTK7、EFNA4、FAP、DR5、CEA、Ly6E、CA6、CEACAM5、LAMP1、tissue factor、EPHA2、DR5、B7-H3、FGFR4、FGFR2、2-PI、A33、GDF15、CAIX、CD166、ROR1、GITR、BCMA、TBA、LAG-3、EphA2、TIM-3、CD-200、EGFRvIII、CD16A、CD32B、PIGF、Axl、MICA/B、Thomsen-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr3、トランスフェリン受容体、TGF、IL-17、5T4、RTK、Immune Suppressor Protein、NaPi2b、ルイス血液型B抗原、A34、Lysil-Oxidase、DLK-1、TROP-2、9インテグリン、TAG-72(CA72-4)、CD70

10

20

## 【0039】

## (2) 自己免疫疾患・炎症性疾患

IL-17、IL-6R、IL-17R、INF-、IL-5R、IL-13、IL-23、IL-6、ActRIIB、7-Integrin、IL-4R、HAS、Eotaxin-1、CD3、CD19、TNF-、IL-15、CD3、Fibronectin、IL-1、IL-1、IL-17、TSLP(Thymic Stromal Lymphopoietin)、LAMP(Alpha4 Beta7 Integrin)、IL-23、GM-CSFR、TSLP、CD28、CD40、TLR-3、BAFF-R、MAdCAM、IL-31R、IL-33、CD74、CD32B、CD79B、IgE(免疫グロブリンE)、IL-17A、IL-17F、C5、FcRn、CD28、TLR4、MCAM、B7RP1、CXCR1,2 Ligands、IL-21、Cadherin-11、CX3CL1、CCL20、IL-36R、IL-10R、CD86、TNF-、IL-7R、Kv1.3、9インテグリン、LI FHT

30

## 【0040】

## (3) 脳神経疾患

CGRP、CD20、アミロイド、アミロイドプロトフィブリン、Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor、LINGO(Ig Domain Containing1)、シヌクレイン、細胞外tau、CD52、インスリン受容体、tauタンパク、TDP-43、SOD1、TauC3、JCウイルス

40

## 【0041】

## (4) 感染症

Clostridium Difficile toxin B、サイトメガロウイルス、RSウイルス、LPS、S. Aureus Alpha-toxin、M2eタンパク、Psl、PcrV、S. Aureus toxin、インフルエンザA、Alginate、黄色ブドウ球菌、PD-L1、インフルエンザB、アシネトバクター、F-protein、Env、CD3、病原性大腸菌、クレブシエラ、肺炎球菌

50

## 【0042】

## (5) 遺伝性・希少疾患

アミロイドAL、SEMA4D(CD100)、インスリン受容体、ANGPTL3、IL4、IL13、FGF23、副腎皮質刺激ホルモン、トランスサイレチン、ハンチンチン

## 【0043】

## (6) 眼疾患

Factor D、IGF-1R、PGDFR、Ang2、VEGF-A、CD-105(Endoglin)、IGF-1R、アミロイド

## 【0044】

## (7) 骨・整形外科領域

Sclerostin、Myostatin、Dickkopf-1、GDF8、RNAKL、HAS、Siglec-15

## 【0045】

## (8) 血液疾患

vWF、Factor IXa、Factor X、IFN、C5、BMP-6、Ferritin、TFPI

## 【0046】

## (9) その他の疾患

BAFF(B cell activating factor)、IL-1、PCSK9、NGF、CD45、TLR-2、GLP-1、TNFR1、C5、CD40、LPA、プロラクチン受容体、VEGFR-1、CB1、Endoglin、PTH1R、CXCL1、CXCL8、IL-1、AT2-R、IAPP

## 【0047】

より好ましい実施形態では、抗体に対する親和性物質は、モノクローナル抗体に対する親和性物質である。モノクローナル抗体のアイソタイプは、抗体について上述したものと同様であるが、IgG(例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)が好ましい。好ましくは、モノクローナル抗体は、全長モノクローナル抗体である。

## 【0048】

さらにより好ましい実施形態では、抗体に対する親和性物質は、全長モノクローナル抗体であるキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体(例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のIgG)に対する親和性物質である。

## 【0049】

特に好ましい実施形態では、抗体に対する親和性物質は、下記(A)~(C)からなる群より選ばれるいずれか一つのFc領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体に対する親和性物質である：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質；

(B) 配列番号1のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質；または

(C) 配列番号1のアミノ酸配列と90%以上の同一性を示すアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質。

## 【0050】

配列番号1のアミノ酸配列は、Fc領域タンパク質である。このようなFc領域タンパク質は、分泌能を有することが知られている。したがって、上記(A)~(C)のFc領域タンパク質は、分泌能を有することができる。また、このようなFc領域タンパク質を含む抗体は、抗原結合能を有することができる。配列番号1における18位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは後述するような非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはロイシン、イソロイシンまたはアラニンであり、特に好ましくはロイシンまたはアラニンである。配列番号1における19位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましく

10

20

30

40

50

は中性アミノ酸残基または酸性アミノ酸残基であり、より好ましくは非極性側鎖を有するアミノ酸残基または酸性アミノ酸残基であり、さらにより好ましくはロイシンまたはグルタミン酸である。配列番号1における21位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはグリシンまたはアラニンである。配列番号1における140位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは酸性アミノ酸残基であり、より好ましくはグルタミン酸またはアスパラギン酸である。配列番号1における142位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはメチオニン、ロイシンまたはイソロイシンであり、特に好ましくはメチオニンまたはロイシンである。配列番号1における177位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは後述するような非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸残基または非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはスレオニン、アラニンまたはグリシンであり、特に好ましくはスレオニンまたはアラニンである。

10

【0051】

好ましい実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列における220~449位のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってもよい。

【0052】

別の好ましい実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列は、配列番号3のアミノ酸配列における7~236位のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってもよい。

20

【0053】

特定の実施形態では、上述したようなアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質を含む抗体は、上述したようなアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質、および抗体の定常領域を含む抗体であってもよい。このような抗体の定常領域としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体(例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のIgG)の定常領域であってもよい。

【0054】

Fc領域タンパク質(B)では、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる1、2、3または4種の変異により、1個または数個のアミノ酸残基が改変され得る。アミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の1つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「1個または数個」は、タンパク質の活性を大きく損なわない個数を示す。用語「1個または数個」が示す数は、例えば、1~100個、好ましくは1~80個、より好ましくは1~50個、1~30個、1~20個、1~10個または1~5個(例、1個、2個、3個、4個、または5個)である。

30

【0055】

Fc領域タンパク質(C)では、配列番号1のアミノ酸配列との同一性%は、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上であってもよい。本発明では、ペプチドまたはポリペプチド(タンパク質)の同一性%の算出は、アルゴリズムblastpにより行うことができる。より具体的には、ポリペプチドの同一性%の算定%は、National Center for Biotechnology Information(NCBI)において提供されているアルゴリズムblastpにおいて、デフォルト設定のScoring Parameters(Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11 Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment)を用いて行うことができる。また、ポリヌクレオチド(遺伝子)の同一性%の算出は、アルゴリズムblastnにより行うことができる。より具体的には、ポリヌクレオチドの同一性%の算定は、NCBIにおいて提供されているアルゴリズムblastnに

40

50

において、デフォルト設定の Scoring Parameters ( Match / Mismatch Scores = 1 , - 2 ; Gap Costs = Linear ) を用いて行うことができる。

【 0 0 5 6 】

分泌能における分泌は、分泌タンパク質の分泌（いわゆる可溶性）と同じ意味である。したがって、「分泌能を有する」とは、通常の抗体と同様に、抗体として機能することを意味する。

【 0 0 5 7 】

上記 Fc 領域タンパク質を含む抗体は、目的の特性（例、分泌能、抗原結合能）を保持する限り、特定の部位に、変異が導入されていてもよい。目的の特性を保持し得る、変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に明らかである。具体的には、当業者は、1）同種の特性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列を比較し、2）相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3）相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識することができる。したがって、当業者は、上記 Fc 領域タンパク質を含む抗体のアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

【 0 0 5 8 】

アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

【 0 0 5 9 】

上記（A）～（C）からなる群より選ばれるいずれか一つの Fc 領域を含む抗体としては、例えば、キメラ抗体（例、リツキシマブ、バシリキシマブ、インフリキシマブ、セツキシマブ、シルツキシマブ、ディヌツキシマブ、オルタトキサシマブ）、ヒト化抗体（例、ダクリツマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレツズマブ、オマリツマブ、エファリツマブ、ベバシツマブ、ナタリツマブ（IgG4）、トシリツマブ、エクリツマブ（IgG2）、モガムリツマブ、ベルツツマブ、オビヌツツマブ、ベドリツマブ、ペンプロリツマブ（IgG4）、メポリツマブ、エロツツマブ、ダラツムマブ、イケセキツマブ（IgG4）、レスリツマブ（IgG4）、アテゾリツマブ）、ヒト抗体（例、アダリムマブ（IgG1）、パニツムマブ、ゴリムマブ、ウステキヌマブ、カナキヌマブ、オファツムマブ、デノスマブ（IgG2）、イピリムマブ、ベリムマブ、ラキシバクマブ、ラムシルマブ、ニボルマブ、デュピルマブ（IgG4）、セクキヌマブ、エボロクマブ（IgG2）、アリロクマブ、ネシツムマブ、プロダルマブ（IgG2）、オララツマブ）が挙げ

10

20

30

40

50

られる ( I g G サブタイプに言及していない場合、 I g G 1 であることを示す )。

【 0 0 6 0 】

本発明で用いられる抗体に対する親和性物質は、以下のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである。

式 1 - 1 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - I - I - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 5 8 )

式 1 - 2 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - I - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 5 9 )

式 1 - 3 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - V - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 0 )

10

式 1 - 4 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - A - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 1 )

式 1 - 5 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - L - L - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 2 )

式 1 - 6 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - L - I - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 3 )

式 1 - 7 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - L - V - F - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 4 )

式 1 - 8 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - Q - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 5 )

20

式 1 - 9 : ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub> - X<sub>a a 2</sub> - X<sub>a a 3</sub> - X<sub>a a 4</sub> - X<sub>a a 5</sub> - X<sub>a a 6</sub> - E - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 6 )

〔 式中、

( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> は、なし、または 1 ~ 3 個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基 ( リジン残基およびシステイン残基以外 ) であり、

X<sub>a a 1</sub> は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

30

X<sub>a a 2</sub> は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X<sub>a a 3</sub> は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X<sub>a a 4</sub> は、リジン残基であり、

X<sub>a a 5</sub> は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

X<sub>a a 6</sub> は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。〕、あるいは

40

式 2 - 1 : ( X<sub>0-3</sub>' )<sub>a</sub> - C - X<sub>a a 1</sub>' - X<sub>a a 2</sub>' - X<sub>a a 3</sub>' - X<sub>a a 4</sub>' - X<sub>a a 5</sub>' - X<sub>a a 6</sub>' - L - V - W - C - ( X<sub>0-3</sub>' )<sub>b</sub> ( 配列番号 6 7 )

〔 式中、

( X<sub>0-3</sub>' )<sub>a</sub> および ( X<sub>0-3</sub>' )<sub>b</sub> はそれぞれ、前記 ( X<sub>0-3</sub> )<sub>a</sub> および ( X<sub>0-3</sub> )<sub>b</sub> と同じであり、

X<sub>a a 1</sub>'、X<sub>a a 2</sub>'、X<sub>a a 3</sub>'、X<sub>a a 4</sub>'、X<sub>a a 5</sub>'、X<sub>a a 6</sub>' はそれぞれ、前記 X<sub>a a 1</sub>、X<sub>a a 2</sub>、X<sub>a a 3</sub>、X<sub>a a 4</sub>、X<sub>a a 5</sub>、X<sub>a a 6</sub> と同じである。

但し、( X<sub>0-3</sub>' )<sub>a</sub> が 1 ~ 3 のアミノ酸残基、( X<sub>0-3</sub>' )<sub>b</sub> が 1 ~ 3 のアミノ酸残基

50

、X a a 3 ' がヒスチジン残基、かつ、X a a 5 ' がグリシン残基の場合を除く。] のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドである。

【 0 0 6 1 】

( X 0 - 3 ) a、( X 0 - 3 ) b、( X 0 - 3 ' ) aおよび( X 0 - 3 ' ) bは、それぞれ独立して、なし、または同一または異なる 1 ~ 3 個の連続する任意のアミノ酸残基(リジン残基およびシステイン残基以外)である。したがって、このような任意のアミノ酸残基は、アラニン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、グリシン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、バリン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、またはヒスチジン残基である。

10

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態では、( X 0 - 3 ) aは、なし、アルギニン残基 - グリシン残基 - アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、アスパラギン残基、グリシン残基 - アスパラギン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であってもよい。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態では、( X 0 - 3 ) bは、なし、スレオニン残基 - チロシン残基 - ヒスチジン残基、スレオニン残基、スレオニン残基 - チロシン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であってもよい。

20

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態では、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 で表されるアミノ酸配列において、以下のとおりであってもよい：

( X 0 - 3 ) aは、なし、アルギニン残基 - グリシン残基 - アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、またはアスパラギン残基であり；

( X 0 - 3 ) bは、なし、スレオニン残基 - チロシン残基 - ヒスチジン残基、またはスレオニン残基であり；

X a a 1 は、アラニン残基であり；

X a a 2 は、チロシン残基、トリプトファン残基、またはヒスチジン残基であり；

X a a 6 は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基である。

30

【 0 0 6 5 】

別の特定の実施形態では、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 で表されるアミノ酸配列において、以下のとおりであってもよい：

( X 0 - 3 ) aは、グリシン残基 - アスパラギン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であり、

( X 0 - 3 ) bは、スレオニン残基 - チロシン残基、グリシン残基、グリシン残基 - グリシン残基、またはグリシン残基 - グリシン残基 - グリシン残基であり、

X a a 1 は、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X a a 2 は、フェニルアラニン残基であり、

X a a 6 は、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。

40

【 0 0 6 6 】

上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 で表されるアミノ酸配列において、X a a 3 は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、好ましくは、ヒスチジン残基である。

【 0 0 6 7 】

上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 で表されるアミノ酸配列において、X a a 5 は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒス

50



チジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、好ましくは、グリシン残基、スレオニン残基、ロイシン残基である。

【 0 0 6 8 】

好ましくは、上記式 1 - 1 ~ 1 - 9、および式 2 - 1 で表されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドは、下記からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含むペプチドである：

- ( 1 ) R G N C A Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 5 ) ;
- ( 2 ) R G N C A Y H K G Q I V W C T Y H ( 配列番号 8 ) ;
- ( 3 ) R G N C A Y H K G Q V V W C T Y H ( 配列番号 9 ) ;
- ( 4 ) R G N C A Y H K G Q A V W C T Y H ( 配列番号 1 0 ) ; 10
- ( 5 ) R G N C A Y H K G Q L L W C T Y H ( 配列番号 1 1 ) ;
- ( 6 ) R G N C A Y H K G Q L I W C T Y H ( 配列番号 1 2 ) ;
- ( 7 ) D C A Y H K G Q I V W C T ( 配列番号 1 3 ) ;
- ( 8 ) D C A Y H K G Q V V W C T ( 配列番号 1 4 ) ;
- ( 9 ) D C A Y H K G Q A V W C T ( 配列番号 1 5 ) ;
- ( 1 0 ) R G N C A Y H K S Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 6 ) ;
- ( 1 1 ) R G N C A Y H K N Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 7 ) ;
- ( 1 2 ) R G N C A Y H K D Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 8 ) ;
- ( 1 3 ) R G N C A Y H K Q Q I I W C T Y H ( 配列番号 1 9 ) ;
- ( 1 4 ) R G N C A Y H K E Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 0 ) ; 20
- ( 1 5 ) R G N C A Y H K F Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 1 ) ;
- ( 1 6 ) R G N C A Y H K Y Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 2 ) ;
- ( 1 7 ) R G N C A Y H K W Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 3 ) ;
- ( 1 8 ) R G N C A Y H K H Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 4 ) ;
- ( 1 9 ) R G N C A Y H K T Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 5 ) ;
- ( 2 0 ) R G N C A Y H K L Q I I W C T Y H ( 配列番号 2 6 ) ;
- ( 2 1 ) C A Y H K L Q I V W C ( 配列番号 2 7 ) ;
- ( 2 2 ) C A Y H K L Q L I W C ( 配列番号 2 8 ) ;
- ( 2 3 ) C A Y H K S Q I V W C ( 配列番号 2 9 ) ;
- ( 2 4 ) R G N C A Y H K G Q L V F C T Y H ( 配列番号 3 0 ) ; 30
- ( 2 5 ) R G N C A Y H K G Q Q V W C T Y H ( 配列番号 3 1 ) ;
- ( 2 6 ) R G N C A Y H K G Q E V W C T Y H ( 配列番号 3 2 ) ;
- ( 2 7 ) C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 3 3 ) ;
- ( 2 8 ) R G N C A Y H K A Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 4 ) ;
- ( 2 9 ) R G N C A Y H K V Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 5 ) ;
- ( 3 0 ) R G N C A Y H K L Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 6 ) ;
- ( 3 1 ) R G N C A Y H K I Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 7 ) ;
- ( 3 2 ) R G N C A Y H K S Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 8 ) ;
- ( 3 3 ) R G N C A Y H K T Q L V W C T Y H ( 配列番号 3 9 ) ;
- ( 3 4 ) R G N C A Y H K N Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 0 ) ; 40
- ( 3 5 ) R G N C A Y H K D Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 1 ) ;
- ( 3 6 ) R G N C A Y H K Q Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 2 ) ;
- ( 3 7 ) R G N C A Y H K E Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 3 ) ;
- ( 3 8 ) R G N C A Y H K F Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 4 ) ;
- ( 3 9 ) R G N C A Y H K R Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 5 ) ;
- ( 4 0 ) R G N C A Y H K H Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 6 ) ;
- ( 4 1 ) R G N C A Y H K W Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 7 ) ;
- ( 4 2 ) R G N C A Y H K Y Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 8 ) ;
- ( 4 3 ) R G N C A Y F K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 4 9 ) ;
- ( 4 4 ) R G N C A Y Y K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 0 ) ; 50

( 4 5 ) R G N C A Y W K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 1 ) ;  
 ( 4 6 ) R G N C A Y R K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 2 ) ;  
 ( 4 7 ) R G N C A Y G K G Q L V W C T Y H ( 配列番号 5 3 ) ;  
 ( 4 8 ) D C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 5 4 ) ;  
 ( 4 9 ) N C A Y H K G Q L V W C ( 配列番号 5 5 ) ;  
 ( 5 0 ) C A Y H K G Q L V W C T ( 配列番号 5 6 ) ;  
 ( 5 1 ) C A Y H K S Q L V W C ( 配列番号 5 7 ) ;  
 ( 5 2 ) R G N C A W H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 6 8 ) ;  
 ( 5 3 ) R G N C A F H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 6 9 ) ;  
 ( 5 4 ) R G N C A H H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 0 ) ;  
 ( 5 5 ) R G N C G Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 1 ) ;  
 ( 5 6 ) R G N C L Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 2 ) ;  
 ( 5 7 ) R G N C P Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 3 ) ;  
 ( 5 8 ) R G N C R Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 4 ) ;  
 ( 5 9 ) R G N C V Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 5 ) ;  
 ( 6 0 ) R G N C N Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 6 ) ;  
 ( 6 1 ) R G N C E Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 7 ) ;  
 ( 6 2 ) R G N C F Y H K G Q I I W C T Y H ( 配列番号 7 8 ) ;  
 ( 6 3 ) R G N C A Y H K G E I I W C T Y H ( 配列番号 7 9 ) ;  
 ( 6 4 ) R G N C A Y H K G N I I W C T Y H ( 配列番号 8 0 ) ;  
 ( 6 5 ) R G N C A Y H K G P I I W C T Y H ( 配列番号 8 1 ) ;  
 ( 6 6 ) R G N C A Y H K G G I I W C T Y H ( 配列番号 8 2 ) ;  
 ( 6 7 ) R G N C A Y H K G D I I W C T Y H ( 配列番号 8 3 ) ;  
 ( 6 8 ) R G N C A Y H K G R I I W C T Y H ( 配列番号 8 4 ) ;  
 ( 6 9 ) R G N C A Y H K G F I I W C T Y H ( 配列番号 8 5 ) ;  
 ( 7 0 ) R G N C A Y H K G H I I W C T Y H ( 配列番号 8 6 ) ;  
 ( 7 1 ) D C A Y H K G Q I I W C T ( 配列番号 8 7 ) ;  
 ( 7 2 ) N C A Y H K G Q I I W C T ( 配列番号 8 8 ) ;  
 ( 7 3 ) G N C A Y H K G Q I I W C T Y ( 配列番号 8 9 ) ;  
 ( 7 4 ) G C A Y H K G Q I I W C G ( 配列番号 9 0 ) ;  
 ( 7 5 ) G G C A Y H K G Q I I W C G G ( 配列番号 9 1 ) ; および  
 ( 7 6 ) G G G C A Y H K G Q I I W C G G G ( 配列番号 9 2 ) 。

【 0 0 6 9 】

上記ペプチドの各アミノ酸配列の中に離間した少なくとも2つのシステイン残基は、ジスルフィド結合により環状ペプチドを形成することができる。あるいは、上記ペプチドにおいて、2つのシステイン残基中のスルフィド基は、以下で表されるカルボニル基含有リンカーにより連結されていてもよい。

【 0 0 7 0 】

【 化 1 5 】



【 0 0 7 1 】

上記で表されるカルボニル基含有リンカーの破線部分は、スルフィド基との結合部分を意味する。当該リンカーは、通常ジスルフィド結合よりも、還元反応等に対して安定である。このようなペプチドは、例えば、国際公開第2016/186206号に記載される方法により、調製することができる。

【 0 0 7 2 】

このような特定の構造を有する新規ペプチドは、ヒトIgG FcにおけるE numberingに従うLys 248残基またはLys 246残基、あるいはLys 248残

10

20

30

40

50

基または Lys 2 4 6 残基以外の他のアミノ酸残基の位置選択的な修飾に有用である（実施例）。上記ペプチドを構成するアミノ酸は L 体または D 体のいずれであってもよいが、L 体が好ましい（実施例ではペプチドを構成するアミノ酸残基は全て L 体である）。

【0073】

上記ペプチドは、架橋剤により特定のアミノ酸残基が修飾されてもよい。このような特定のアミノ酸残基としては、例えば、リジン残基、アスパラギン酸残基、およびグルタミン酸残基が挙げられるが、好ましくは、リジン残基である。架橋剤としては、例えば、DSG (disuccinimidyl glutarate、ジスクシンイミジルグルタレート)、DSS (disuccinimidyl suberate、ジスクシンイミジルスベレート) 等のスクシンイミジル基を好ましくは 2 以上含む架橋剤、DMA (dimethyl adipimidate · 2 HCl、アジプイミド酸ジメチル二塩酸塩)、DMP (dimethyl pimelimidate · 2 HCl、ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩)、及び DMS (dimethyl suberimidate · 2 HCl、スベリイミド酸ジメチル二塩酸塩) 等のイミド酸部分を好ましくは 2 以上含む架橋剤、並びに DTBP (dimethyl 3, 3' - dithiobispropionimidate · 2 HCl、3, 3' - ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル二塩酸塩) 及び DSP (dithiobis(succinimidyl propionate)、ジチオビススクシンイミジルプロピオン酸) 等の S-S 結合を有する架橋剤が挙げられる（例、国際公開第 2016/186206 号）。

【0074】

上記ペプチドは、末端にあるアミノ基およびカルボキシ基が保護されていてもよい。N - 末端アミノ基の保護基としては、例えば、アルキルカルボニル基（アシル基）（例、アセチル基、プロポキシ基、tert - ブトキシカルボニル基等のブトキシカルボニル基）、アルキルオキシカルボニル基（例、フルオレニルメトキシカルボニル基）、アリーロキシカルボニル基、アリーロアルキル（アラルキル）オキシカルボニル基（例、ベンジルオキシカルボニル基）が挙げられる。N - 末端アミノ基の保護基としては、アセチル基が好ましい。C - 末端カルボキシ基の保護基としては、例えば、エステルまたはアミドを形成可能な基が挙げられる。エステルまたはアミドを形成可能な基としては、例えば、アルキルオキシ基（例、メチルオキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ）、アリーロキシ基（例、フェニルオキシ、ナフチルオキシ）、アラルキルオキシ基（例、ベンジルオキシ）、アミノ基が挙げられる。C - 末端カルボキシ基の保護基としては、アミノ基が好ましい。

【0075】

1 - 3 . リンカー (L)

式 (I) において、L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーである。

【0076】

L で表される切断性リンカーは、切断性部分を含む 2 価の基である。切断性部分は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下での特定の処理により切断可能な部位である。したがって、切断性部分は、温和な条件下での特定の切断処理により切断可能な部位（アミド結合以外の結合）であるということができる。このような特定の処理としては、例えば、(a) 酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる 1 種以上の物質による処理、(b) 光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または (c) 自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置が挙げられる。このような切断性リンカーおよびその切断条件は、当該分野における技術常識である（例、G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 571 (2012); Feng P. et al., *Journal of American Chemical Society*, 132, 1500 (2010); Bessodes M. et al., *Journal of Controlled Release*, 99, 423 (2004); DeSimone, J. M.,

Journal of American Chemical Society, 132, 17928 (2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187 (2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291 (2004)。このような切断性部分としては、例えば、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアシル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基（例、tert-ブチルオキシカルバメート残基）、シラン残基、ヒドラゾン含有残基（例、ヒドラゾン残基、アシルヒドラゾン残基、ビスアリールヒドラゾン残基）、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基が挙げられる。

10

## 【0077】

電子吸引基を有する芳香族環基は、アリール、アラルキル、芳香族複素環基、芳香族複素環基を有するアルキルからなる群より選ばれる芳香族環基を有するものが好ましく、アラルキル、芳香族複素環基を有するアルキルがより好ましい。電子吸引基は、環の2位に結合していることが好ましい。さらにより好ましくは、電子吸引基を有する芳香族環含有残基は、例えば、2位に電子吸引基を有するアラルキル（例、ベンジル）である。電子吸引基としては、例えば、ハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されたアルキル（例、トリフルオロメチル）、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレート、ニトロ、シアノ、フェニル基、ケト基（例、アシル）が挙げられる。

20

## 【0078】

切断性部分としての残基の名称に関連して接頭語、接尾語等の用語として見出されるアルキル、アシル（すなわち、アルキルカルボニル）、アルコキシ（すなわち、アルキルオキシ）、アリール、アラルキル等の基の定義、例、および好ましい例は、後述するものと同様である。

## 【0079】

エステル残基としては、例えば、炭素原子および酸素原子から構成される通常のエステル残基〔例、アルキルエステル（例、tert-ブチルオキシカルボニル等の三級アルキルオキシカルボニル）、アリールエステル（例、フェナシルエステル、2-（ジフェニルホスフィノ）ベンゾエート）、グリコシルエステル残基、オルトエステル残基〕、硫黄原子および酸素原子を含むエステル残基（例、 $\alpha$ -チオフェニルエステル残基、アルキルチオエステル残基等のチオエステル残基）、リン原子および酸素原子を含むエステル残基（例、ホスホジエステル残基、ホスホトリエステル残基）、活性化エステル残基（例、N-ヒドロキシスクシンイミド残基）が挙げられる。

30

## 【0080】

スルホン含有残基としては、例えば、スルホン残基、キノリニルベンゼンスルフォネート残基が挙げられる。

## 【0081】

シラン残基は、好ましくは、アルキル、アリール、アラルキル、およびアルコキシからなる群より選ばれる基を有するシラン残基である。このようなシラン残基としては、例えば、ジアルキルジアルコキシシラン残基（例、ジメチルジアルコキシシラン、ジエチルジアルコキシシラン）、またはジアリールジアルコキシシラン残基（例、ジフェニルジアルコキシシラン）が挙げられる。

40

## 【0082】

アルコキシアシル（すなわち、アルキルオキシアシル）残基としては、後述するアルキルオキシおよびアルキルを組み合わせた基であり（アルキルオキシおよびアルキルの定義、例および好ましい例は、後述するものと同様）、例えば、メトキシメチル残基、エトキシメチル残基、メトキシエチル残基、エトキシエチル残基が挙げられるが、これらに限定されない。

50

## 【0083】

不飽和結合含有鎖残基は、炭素原子のみからなる不飽和結合部分を含む残基（例、炭素原子間二重結合を有する最小単位であるビニル（エチニル）、または炭素原子間三重結合を有する最小単位であるアセチレニル（エチニル））、または炭素原子およびヘテロ原子（例、窒素原子、硫黄原子、酸素原子）からなる不飽和結合部分（例、アルデヒド、シアノ）を含む残基である。不飽和結合含有鎖残基としては、例えば、ビニルエーテル残基、シアノエチル残基、エチレン残基、マロンジアルデヒド残基が挙げられる。

## 【0084】

酸性物質（求電子試薬とも称される）としては、例えば、塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸性物質、およびギ酸、酢酸、4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンプロパンスルホン酸、3 - モルホリノプロパンスルホン酸、リン酸二水素ナトリウム、クエン酸、ドデシル硫酸、N - ドデカノイルサルコシン酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸性物質が挙げられる。酸性物質により切断可能な部位としては、例えば、アルキルオキシアリアルキル残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、アセタール残基、シラン残基、イミン残基、ビニルエーテル残基、チオプロピオネート残基、トリチル残基、ヒドラゾン残基、アコニチル残基、オルトエステル残基、カルバモイル残基、2 - (ジフェニルホスフィノ)ベンゾエート残基が挙げられる。

10

## 【0085】

塩基性物質（求核試薬とも称される）としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム等の無機塩基性物質、およびヒドロキシルアミン、トリエチルアミン、N, N' - ジイソプロピルアミン等の有機塩基性物質が挙げられる。塩基性物質により切断可能な部位としては、例えば、シラン残基、シアノエチル残基、スルホン残基、エチレン残基、グリコシルジスクシネート残基、チオフェニルエステル残基、不飽和ビニルスルフィド残基、マロンジアルデヒド残基、アシルヒドラゾン残基、アルキルチオエステル残基が挙げられる。

20

## 【0086】

還元剤としては、例えば、システイン、ジチオトレイトール、還元型グルタチオン、-メルカプトエタノールが挙げられる。還元剤により切断可能な部位としては、例えば、ジスルフィド残基、アルコキシアルキル残基、アゾ残基が挙げられる。

## 【0087】

酸化剤としては、例えば、過ヨウ素酸ナトリウム、酸化型グルタチオンが挙げられる。酸化剤により切断可能な部位としては、例えば、ビシナルジオール残基、セレン残基が挙げられる。

30

## 【0088】

酵素としては、例えば、トリプシン、パパイン、TEV、トロンピン、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンK、カスパーゼ、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、リパーゼ、エンドグリコシターゼ、PNガーゼFが挙げられる。酵素により切断可能な部位としては、例えば、エステル残基、ホスホジエステル残基、グリコシル残基が挙げられる。

## 【0089】

光により切断可能な部位としては、例えば、2 - ニトロベンジル残基、フェナシルエステル残基、8 - キノリンベンゼンスルホナート残基、クマリン残基、ホスホトリエステル残基、ビスアリアルヒドラゾン残基、ピマンジチオプロピオン酸残基が挙げられる。

40

## 【0090】

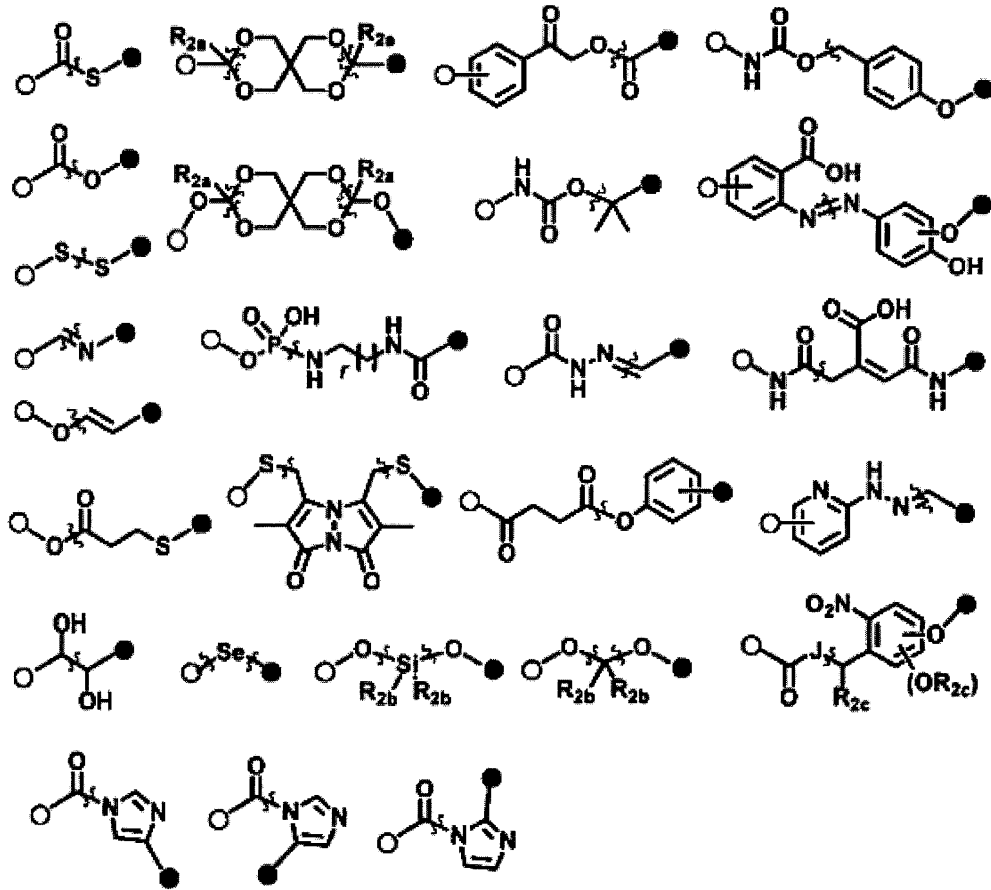
自己分解性の切断性部分としては、例えば、活性化エステル残基（例、N - ヒドロキシスクシンイミド残基）が挙げられる。

## 【0091】

より具体的には、切断性部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

50

## 【化 1 6】



10

20

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の  $R_{2a}$ 、複数の  $R_{2b}$ 、および複数の  $R_{2c}$  は、同一または異なって、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれ、

$J$  は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または  $-S-$  であり、

$r$  は、1 ~ 4 の任意の整数であり、

30

(白丸) は A (または後述する  $L_a$ ) に対する結合を示し、(黒丸) は B (または後述する  $L_b$ ) に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、 $J$  が A (または後述する  $L_a$ ) に対する結合を示し、 $J$  が B (または後述する  $L_b$ ) に対する結合を示していてもよい。〕

## 【0092】

$J$  は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または  $-S-$  である。 $j$  は、好ましくは  $-CH_2-$  または  $-O-$  であり、より好ましくは好ましくは  $-CH_2-$  である。

## 【0093】

$r$  は、1 ~ 4 の任意の整数であり、好ましくは 1 ~ 3 の任意の整数であり、より好ましくは 1 または 2 である。

40

## 【0094】

一実施形態では、切断性リンカーは、(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー、もしくは (ii) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであってもよい。

## 【0095】

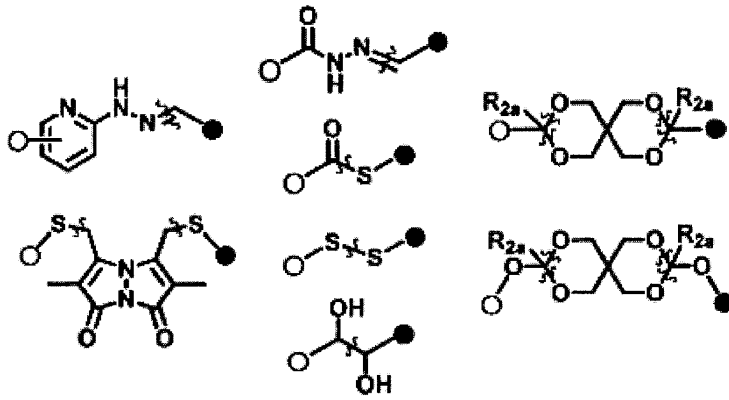
(i) の切断性部分としては、例えば、ジスルフィド残基、エステル残基、アセタール残基、ケタール残基、イミン残基、ピシナルジオール残基が挙げられる。

## 【0096】

より具体的には、(i) の切断性部分は、例えば、以下：

50

## 【化 17】



10

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の  $R_{2a}$  は、同一または異なって、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれ、

(白丸) は A (または後述する  $L_a$ ) に対する結合を示し、(黒丸) は B (または後述する  $L_b$ ) に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、 $\text{---}$  が A (または後述する  $L_a$ ) に対する結合を示し、 $\text{---}$  が B (または後述する  $L_b$ ) に対する結合を示していてもよい。)

20

## 【0097】

(ii) の切断性部分としては、例えば、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基が挙げられる。

## 【0098】

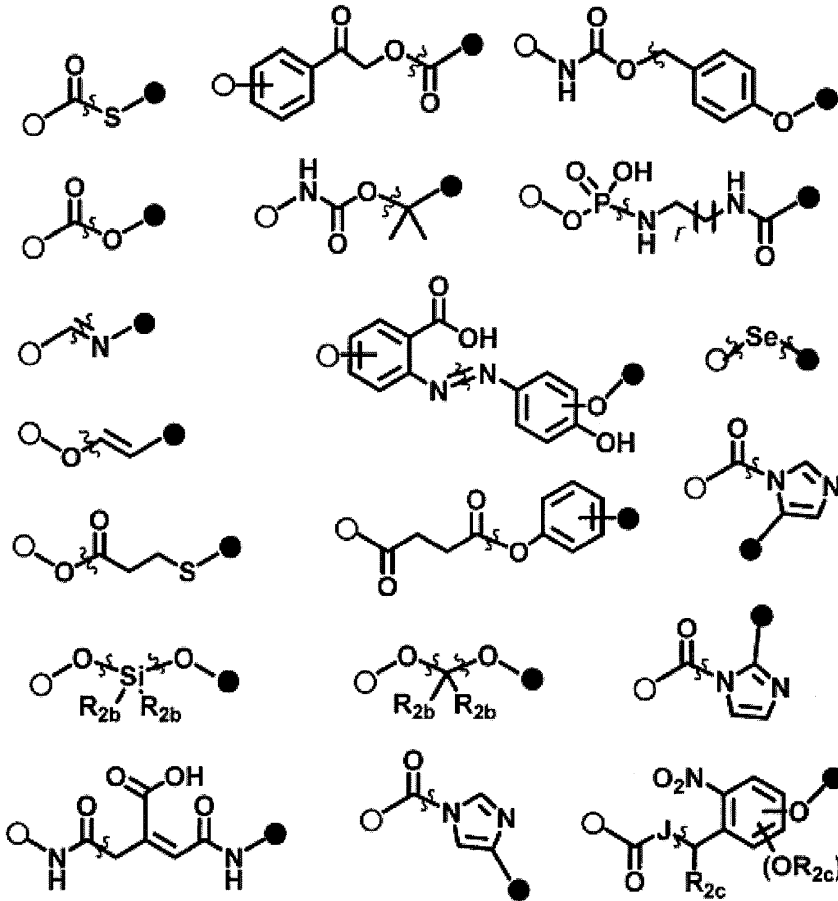
より具体的には、(ii) の切断性部分は、例えば、以下：

30

40

50

## 【化 18】



10

20

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の  $R_{2b}$ 、複数の  $R_{2c}$ 、 $J$ 、 $r$  は、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれ、

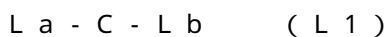
(白丸) は  $A$  (または後述する  $L_a$ ) に対する結合を示し、(黒丸) は  $B$  (または後述する  $L_b$ ) に対する結合を示す。

30

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、 $\text{---}$  が  $A$  (または後述する  $L_a$ ) に対する結合を示し、 $\text{---}$  が  $B$  (または後述する  $L_b$ ) に対する結合を示していてもよい。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

## 【0099】

特定の実施形態では、切断性リンカー ( $L$ ) は、下記式 ( $L1$ ) ~ ( $L3$ ) のいずれか一つで表されてもよい:



〔式中、

$L_a$  および  $L_b$  は、それぞれ、2 価の基であり、

$C$  は、切断性部分である。〕

40

## 【0100】

2 価の基としては、例えば、置換基を有していてもよい 2 価の炭化水素基、置換基を有していてもよい 2 価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_a-$  ( $R_a$  は水素原子、または置換基を示す)、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=S)-$ 、およびこれらの 2 以上 (例えば 2 ~ 8、好ましくは 2 ~ 6、より好ましくは 2 ~ 4) の組み合わせからなる基が挙げられる。

## 【0101】

2 価の炭化水素基としては、直鎖、分岐鎖、または環状の 2 価の炭化水素基であり、好ましくは直鎖または分岐鎖の 2 価の炭化水素基である。2 価の炭化水素基としては、例え

50



ば、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレンが挙げられる。

【0102】

アルキレンとしては、炭素原子数1～12のアルキレンが好ましく、炭素原子数1～6のアルキレンがより好ましく、炭素原子数1～4のアルキレンが特に好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アルキレンは、直鎖、分岐鎖、または環状のいずれであってもよいが、直鎖のアルキレンが好ましい。このようなアルキレンとしては、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレンが挙げられる。

【0103】

アルケニレンとしては、炭素原子数2～12のアルケニレンが好ましく、炭素原子数2～6のアルケニレンがより好ましく、炭素原子数2～4のアルケニレンが特に好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アルケニレンは、直鎖、分岐鎖、または環状のいずれであってもよいが、直鎖のアルケニレンが好ましい。このようなアルケニレンとしては、例えば、エチレニレン、プロピニレン、ブテニレン、ペンテニレン、ヘキセニレンが挙げられる。

10

【0104】

アルキニレンとしては、炭素原子数2～12のアルキニレンが好ましく、炭素原子数2～6のアルキニレンがより好ましく、炭素原子数2～4のアルキニレンが特に好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アルキニレンは、直鎖、分岐鎖、または環状のいずれであってもよいが、直鎖のアルキニレンが好ましい。このようなアルキニレンとしては、例えば、エチニレン、プロピニレン、ブチニレン、ペンチニレン、ヘキシニレンが挙げられる。

20

【0105】

アリーレンとしては、炭素原子数6～24のアリーレンが好ましく、炭素原子数6～18のアリーレンがより好ましく、炭素原子数6～14のアリーレンがさらに好ましく、炭素原子数6～10のアリーレンがさらにより好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アリーレンとしては、例えば、フェニレン、ナフチレン、アントラセニレンが挙げられる。

【0106】

2価の複素環基は、2価の芳香族複素環基、または2価の非芳香族複素環基である。複素環を構成するヘテロ原子として、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子、ホウ素原子およびケイ素原子からなる群から選択される1種以上を含むことが好ましく、酸素原子、硫黄原子および窒素原子からなる群から選択される1種以上を含むことがより好ましい。

30

【0107】

2価の芳香族複素環基としては、炭素原子数1～21の2価の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数1～15の2価の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数1～9の2価の芳香族複素環基がさらに好ましく、炭素原子数1～6の2価の芳香族複素環基がさらにより好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。より具体的には、2価の芳香族複素環基としては、例えば、ピロールジイル、フランジイル、チオフェンジイル、ピリジンジイル、ピリダジンジイル、ピリミジンジイル、ピラジンジイル、トリアジンジイル、ピラゾールジイル、イミダゾールジイル、チアゾールジイル、イソチアゾールジイル、オキサゾールジイル、イソオキサゾールジイル、トリアゾールジイル、テトラゾールジイル、インドールジイル、プリンジイル、アントラキノンジイル、カルバゾールジイル、フルオレンジイル、キノリンジイル、イソキノリンジイル、キナゾリンジイル、およびフタラジンジイルが挙げられる。

40

【0108】

2価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数2～21の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数2～15の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数2～9の非芳香族複素環基がさらに好ましく、炭素原子数2～6の非芳香族複素環基がさらにより好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。より具体的には、2価の非芳香族

50

複素環基としては、例えば、ピロールジオンジイル、ピロリンジジオンジイル、オキシランジオンジイル、アジリンジジオンジイル、アゼチンジジオンジイル、オキセタンジオンジイル、チエタンジオンジイル、ピロリンジジオンジイル、ジヒドロフランジオンジイル、テトラヒドロフランジオンジイル、ジオキサランジオンジイル、テトラヒドロチオフェンジオンジイル、ピロリンジジオンジイル、イミダゾリンジジオンジイル、オキサゾリンジジオンジイル、ピペリンジジオンジイル、ジヒドロピランジオンジイル、テトラヒドロピランジオンジイル、テトラヒドロチオピランジオンジイル、モルホリンジジオンジイル、チオモルホリンジジオンジイル、ピペラジンジジオンジイル、ジヒドロオキサジンジジオンジイル、テトラヒドロオキサジンジジオンジイル、ジヒドロピリミジジオンジイル、およびテトラヒドロピリミジジオンジイルが挙げられる。

【0109】

L<sub>a</sub>およびL<sub>b</sub>で表される2価の基は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個の置換基を有していてもよい。このような置換基は、上記R<sub>a</sub>およびR<sub>b</sub>で表される置換基と同様である。このような置換基としては、例えば、以下が挙げられる：

(i) ハロゲン原子；

(ii) 1価の炭化水素基；

(iii) アラルキル；

(iv) 1価の複素環基；

(v) R<sub>c</sub>-O-、R<sub>c</sub>-C(=O)-、R<sub>c</sub>-O-C(=O)-、もしくはR<sub>c</sub>-C(=O)-O- (R<sub>c</sub>は、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；または

(vi) NR<sub>d</sub>Re-、NR<sub>d</sub>Re-C(=O)-、NR<sub>d</sub>Re-C(=O)-O-、もしくはR<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>- (R<sub>d</sub>およびR<sub>e</sub>は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；

(vii) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、およびカルボキシル基。

【0110】

ハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

【0111】

1価の炭化水素基としては、例えば、1価の鎖状炭化水素基、1価の脂環式炭化水素基、および1価の芳香族炭化水素基が挙げられる。

【0112】

1価の鎖状炭化水素基とは、鎖状構造のみで構成された炭化水素基を意味し、主鎖に環状構造を含まない。ただし、鎖状構造は直鎖状であっても分岐状であってもよい。1価の鎖状炭化水素基としては、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニルが挙げられる。アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、直鎖状、または分岐状のいずれであってもよい。

【0113】

アルキルとしては、炭素原子数1～12のアルキルが好ましく、炭素原子数1～6のアルキルがより好ましく、炭素原子数1～4のアルキルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数1～12のアルキルとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシルが挙げられる。

【0114】

アルケニルとしては、炭素原子数2～12のアルケニルが好ましく、炭素原子数2～6のアルケニルがより好ましく、炭素原子数2～4のアルケニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数2～12のアルケニルとしては、例えば、ビニル、プロペニル、n-ブテニルが挙げられる。

【0115】

アルキニルとしては、炭素原子数2～12のアルキニルが好ましく、炭素原子数2～6のアルキニルがより好ましく、炭素原子数2～4のアルキニルがさらに好ましい。上記炭

10

20

30

40

50

素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 2 ~ 12 のアルキニルとしては、例えば、エチニル、プロピニル、n - ブチニルが挙げられる。

【0116】

1 価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

【0117】

1 価の脂環式炭化水素基とは、環構造として脂環式炭化水素のみを含み、芳香族環を含まない炭化水素基を意味し、脂環式炭化水素は単環、多環のいずれであってもよい。ただし、脂環式炭化水素のみで構成されている必要はなく、その一部に鎖状構造を含んでいてもよい。1 価の脂環式炭化水素基としては、例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニルが挙げられ、これらは、単環、多環のいずれであってもよい。

10

【0118】

シクロアルキルとしては、炭素原子数 3 ~ 12 のシクロアルキルが好ましく、炭素原子数 3 ~ 6 のシクロアルキルがより好ましく、炭素原子数 5 ~ 6 のシクロアルキルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 3 ~ 12 のシクロアルキルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルが挙げられる。

【0119】

シクロアルケニルとしては、炭素原子数 3 ~ 12 のシクロアルケニルが好ましく、炭素原子数 3 ~ 6 のシクロアルケニルがより好ましく、炭素原子数 5 ~ 6 のシクロアルケニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 3 ~ 12 のシクロアルケニルとしては、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニルが挙げられる。

20

【0120】

シクロアルキニルとしては、炭素原子数 3 ~ 12 のシクロアルキニルが好ましく、炭素原子数 3 ~ 6 のシクロアルキニルがより好ましく、炭素原子数 5 ~ 6 のシクロアルキニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 3 ~ 12 のシクロアルキニルとしては、例えば、シクロプロピニル、シクロブチニル、シクロペンチニル、シクロヘキシニルが挙げられる。

【0121】

1 価の脂環式炭化水素基としては、シクロアルキルが好ましい。

30

【0122】

1 価の芳香族炭化水素基とは、芳香族環構造を含む炭化水素基を意味する。ただし、芳香族環のみで構成されている必要はなく、その一部に鎖状構造や脂環式炭化水素を含んでいてもよく、芳香族環は単環、多環のいずれであってもよい。1 価の芳香族炭化水素基としては、炭素原子数 6 ~ 12 のアリールが好ましく、炭素原子数 6 ~ 10 のアリールがより好ましく、炭素原子数 6 のアリールがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 6 ~ 12 のアリールとしては、例えば、フェニル、ナフチルが挙げられる。

【0123】

1 価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

40

【0124】

これらの中でも、1 価の炭化水素基としては、アルキル、シクロアルキル、アリールが好ましく、アルキルがより好ましい。

【0125】

アラルキルとは、アリールアルキルをいう。アリールアルキルにおけるアリールおよびアルキルの定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。アラルキルとしては、炭素原子数 3 ~ 15 のアラルキルが好ましい。このようなアラルキルとしては、例えば、ベンゾイル、フェネチル、ナフチルメチル、ナフチルエチルが挙げられる。

【0126】

1 価の複素環基とは、複素環式化合物の複素環から水素原子 1 個を除いた基をいう。1

50

価の複素環基は、1価の芳香族複素環基、または1価の非芳香族複素環基である。複素環基を構成するヘテロ原子として、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子、ホウ素原子及びケイ素原子からなる群から選択される1種以上を含むことが好ましく、酸素原子、硫黄原子及び窒素原子からなる群から選択される1種以上を含むことがより好ましい。

## 【0127】

1価の芳香族複素環基としては、炭素原子数1～15の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数1～9の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数1～6の芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。1価の芳香族複素環基としては、例えば、ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、インドリル、プリニル、アントラキノリル、カルバゾニル、フルオレニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、及びフタラジニルが挙げられる。

10

## 【0128】

1価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数2～15の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数2～9の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数2～6の非芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。1価の非芳香族複素環基としては、例えば、オキシラニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロフラニル、ジオキサソラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペラジニル、ジヒドロオキサジニル、テトラヒドロオキサジニル、ジヒドロピリミジニル、及びテトラヒドロピリミジニルが挙げられる。

20

## 【0129】

これらの中でも、1価の複素環基としては、5員または6員の複素環基が好ましい。

## 【0130】

好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 炭素原子数1～12のアルキル、フェニル、もしくはナフチル；

(iii') 炭素原子数3～15のアラルキル；

30

(iv') 5員または6員の複素環；

(v')  $R_c - O -$ 、 $R_c - C(=O) -$ 、 $R_c - O - C(=O) -$ 、もしくは $R_c - C(=O) - O -$  ( $R_c$ は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

または

(vi')  $N R_d R_e -$ 、 $N R_d R_e - C(=O) -$ 、 $N R_d R_e - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_d - C(=O) - N R_e -$  ( $R_d$ および $R_e$ は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

(vii') 上記(vii)で列挙したものと同一基。

## 【0131】

より好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

40

(i'') ハロゲン原子；

(ii'') 炭素原子数1～12のアルキル；

(iii'')  $R_c - O -$ 、 $R_c - C(=O) -$ 、 $R_c - O - C(=O) -$ 、もしくは $R_c - C(=O) - O -$  ( $R_c$ は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

または

(iv'')  $N_d R R_e -$ 、 $N R_d R_e - C(=O) -$ 、 $N R_d R_e - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_d - C(=O) - N R_e -$  ( $R_d$ および $R_e$ は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

(v'') 上記(vii)で列挙したものと同一基。

## 【0132】

50

さらにより好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i'')ハロゲン原子；

(iii')炭素原子数1～6のアルキル；

(iiii') RO-、R<sub>c</sub>-C(=O)-、R<sub>c</sub>-O-C(=O)-、もしくはR<sub>c</sub>-C(=O)-O-(R<sub>c</sub>は、水素原子、もしくは炭素原子数1～6のアルキルを示す。)

；または

(iv') NR<sub>e</sub>-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-O-、もしくはR<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>-(R<sub>d</sub>およびR<sub>e</sub>は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～6のアルキルを示す。)

；(v')上記(vi)で列挙したものと同一基。

10

【0133】

特に好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i''')ハロゲン原子；

(iii'')炭素原子数1～4のアルキル；

(iiii'') R<sub>c</sub>-C(=O)-、R<sub>c</sub>-O-C(=O)-、もしくはR<sub>c</sub>-C(=O)-O-(R<sub>c</sub>は、水素原子、もしくは炭素原子数1～4のアルキルを示す。)

；または

(iv'') NR<sub>e</sub>-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-O-、もしくはR<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>-(R<sub>d</sub>およびR<sub>e</sub>は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～4のアルキルを示す。)

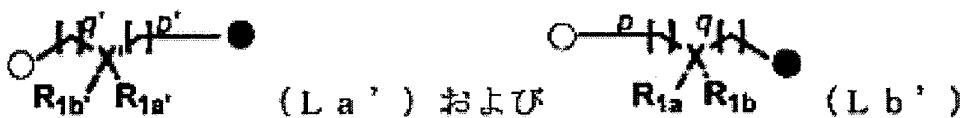
20

；(v'')上記(vi)で列挙したものと同一基。

【0134】

特定の実施形態では、L<sub>a</sub>およびL<sub>b</sub>は、それぞれ、下記(L<sub>a</sub>')および(L<sub>b</sub>')：

【化19】



〔式中、

pおよびp'は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

30

qおよびq'は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

XおよびX'は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合(ここで、Xが窒素原子である場合、R<sub>1b</sub>は存在せず、X'が窒素原子である場合、R<sub>b</sub>は存在しない。Xが単結合である場合、R<sub>1a</sub>およびR<sub>1b</sub>は存在せず、X'が単結合である場合、R<sub>a</sub>およびR<sub>1b</sub>は存在しない)であり、

R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub>およびR<sub>1b</sub>は、同一または異なって、水素原子、または上述する置換基からなる群より選ばれる。)で表されてもよい。

【0135】

pおよびp'は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、好ましくは0～8の整数であり、より好ましくは0～6の整数であり、さらにより好ましくは0～4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。好ましくは、pおよびp'は、同一である。

40

【0136】

qおよびq'は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、好ましくは0～8の整数であり、より好ましくは0～6の整数であり、さらにより好ましくは0～4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。好ましくは、qおよびq'は、同一である。

【0137】

XおよびX'は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合であり、好ましくは炭素原子または単結合である。好ましくは、XおよびX'は、同一である。

50

## 【0138】

R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は、同一または異なって、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれる。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。好ましくは、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub> および R<sub>1b</sub> は、水素原子である。

## 【0139】

1-4. (a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない2価の基 (B)

式 (I) において、B は、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない2価の基である。

## 【0140】

生体直交性官能基とは、生体構成成分 (例、アミノ酸、核酸、脂質、糖、リン酸) とは反応しない、もしくは生体構成成分に対する反応の速度が遅いが、生体構成成分以外の成分に対して選択的に反応する基をいう。生体直交性官能基は、当該技術分野において周知である (例、Sharpless K. B. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2004 (2015); Bertozzi C. R. et al., *Science* 291, 2357 (2001); Bertozzi C. R. et al., *Nature Chemical Biology* 1, 13 (2005) を参照)。

## 【0141】

親和性物質の標的が抗体である場合、生体直交性官能基は、タンパク質に対する生体直交性官能基である。タンパク質に対する生体直交性官能基とは、タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸残基の側鎖と反応せずに、所定の官能基と反応する基である。タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸は、アラニン (A)、アスパラギン (N)、システイン (C)、グルタミン (Q)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、スレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、バリン (V)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、およびリジン (L) である。これらの天然の20種のアミノ酸のうち、側鎖がない (すなわち、水素原子である) グリシン、ならびに側鎖が炭化水素基である (すなわち、硫黄原子、窒素原子、および酸素原子からなる群より選ばれるヘテロ原子を側鎖に含まない) アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、およびバリンは、通常の反応に対して不活性である。したがって、タンパク質に対する生体直交性官能基は、通常の反応に対して不活性である側鎖を有するこれらのアミノ酸の側鎖に加えて、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンの側鎖に対しても反応できない官能基である。

## 【0142】

タンパク質に対して反応できないこのような生体直交性官能基としては、例えば、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルケン残基 (換言すれば、炭素原子間二重結合を有する最小単位であるビニレン (エチニレン) 部分を有していればよい。以下同様)、アルキン残基 (換言すれば、炭素原子間三重結合を有する最小単位であるエチニレン部分を有していればよい。以下同様)、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基 (例、 $\alpha$  位にフッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を有するカルボニル残基。以下同様)、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基が挙げられる。タンパク質としては、遊離のチオール (システイン) を含むタンパク質 (例、抗体以外のタンパク質)、および遊離のチオールを含み得ないタンパク質 (例、抗体) が存在する。遊離のチオールを含み得ないタンパク質においては、チオールが生体直交性官能基として機能する。したがって、親和性物質の標的が、遊離のチオールを含み得ない抗体であることから、生体直交性官能基にはチオールが

10

20

30

40

50

含まれる。1種または2種以上（例、2種、3種、4種）の生体直交性官能基が2価の基に含まれていてもよいが、好ましくは、1種の生体直交性官能基が2価の基に含まれていてもよい。

【0143】

一実施形態では、生体直交性官能基を含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基であってもよい。

10

【0144】

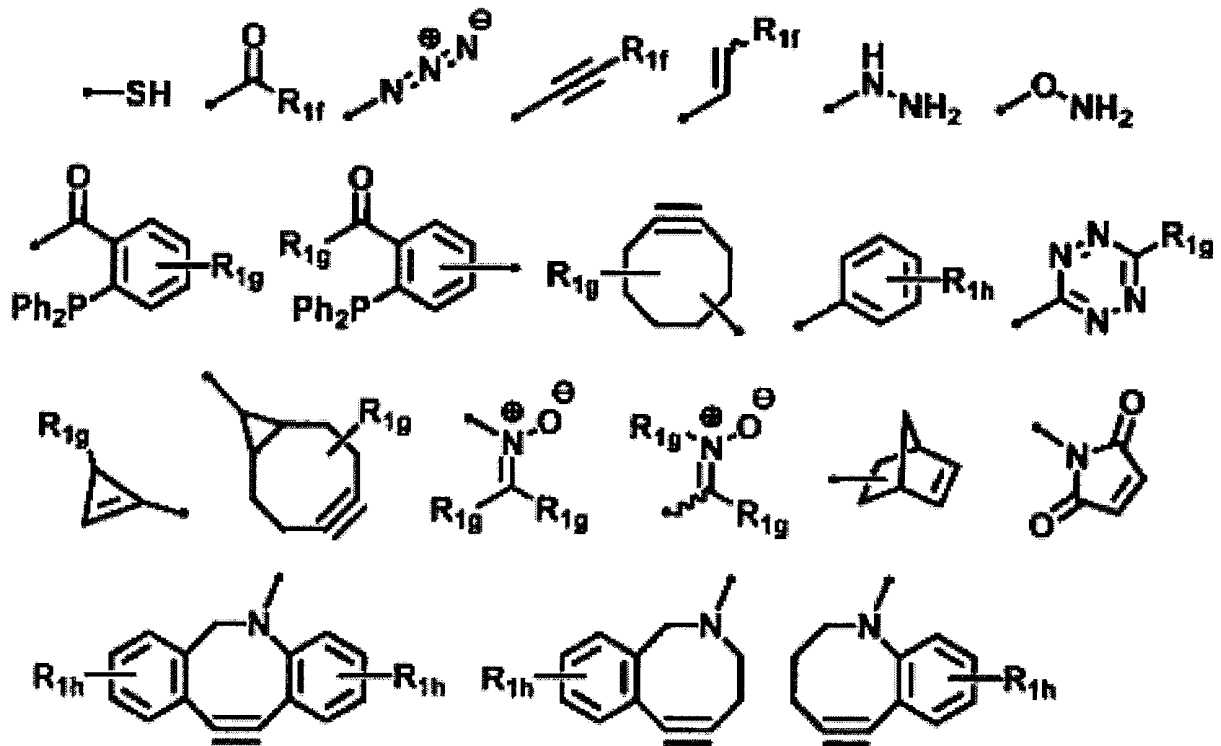
別の実施形態では、生体直交性官能基を含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、 $\alpha$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基であってもよい。

【0145】

より具体的には、生体直交性官能基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

20

【化20】



30

40

〔式中、

$R_{1f}$ 、単一もしくは複数の $R_{1g}$ および単一もしくは複数の $R_{1h}$ は、同一もしくは異なって、前記(i)~(vii)からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。)

【0146】

電子吸引基としては、例えば、上述したものが挙げられるが、ハロゲン原子、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレートが好ましい。

【0147】

50

一実施形態では、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基であってもよい。2価の基に含まれる生体直交性官能基の数は、単一または複数であり、例えば1~5、好ましくは1~3、より好ましくは1または2、さらにより好ましくは1である。2価の基に含まれる生体直交性官能基の数が複数である場合、複数の生体直交性官能基は、同種であっても異種であってもよいが、単純な構造の採用等の観点では、同種であることが好ましい。  
【0148】

特定の実施形態では、Bは、(a1)生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基であってもよい。生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、 $\beta$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基自体を2価の基とするもの、またはこのような2価の生体直交性官能基のいずれか一方の末端または両端に上述した2価の基が連結されている基である。連結されるべき2価の基の定義、例および好ましい例は、上述した2価の基と同様である。

10

【0149】

別の特定の実施形態では、Bは、(a2)生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基であってもよい。生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、 $\beta$ -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基またはそれを含む基で置換された2価の基である。置換されるべき2価の基の定義、例および好ましい例は、上述した2価の基と同様である。

20

【0150】

別の実施形態では、Bは、(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であってもよい。このような2価の基は、置換されていてもよいアルキレン、置換されていてもよいシクロアルキレン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよい2価の複素環基、 $-NR_a-$  ( $R_a$ は水素原子、または置換基を示す)、 $-O-$ 、およびこれらの2以上の組み合わせ(例えば2~8、好ましくは2~6、より好ましくは2~4)からなる基であってもよい。置換されていてもよい場合の置換基、および $R_a$ の置換基は、生体直交性官能基以外の置換基である。このような置換基としては、例えば、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、1価の複素環基、ヒドロキシル、アミノ、アルキルオキシ(アルコキシ)、シクロアルキルオキシ、アラルキルオキシが挙げられる。このような置換基の数は、例えば1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1もしくは2個、さらにより好ましくは1個である。

30

【0151】

生体直交性官能基以外の置換基について、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、1価の複素環基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。

40

【0152】

生体直交性官能基以外の置換基について、アルキルオキシ(アルコキシ)におけるアルキル、シクロアルキルオキシにおけるシクロアルキル、およびアラルキルオキシにおけるアラルキルの定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。より具体的には、アルキルオキシとしては、例えば、メチルオキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ(例、*n*-プロピルオキシ、*iso*-プロピルオキシ)、ブチルオキシ(例、*n*-ブチルオキシ、*iso*-ブチルオキシ、*sec*-ブチルオキシ、*tert*-ブチルオキシ)、ペンチルオキシ(例、*n*-ペンチルオキシ)、ヘキシルオキシ(例、*n*-ヘキシルオキシ)が挙げられる。シクロアルキルオキシとしては、例えば、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオ

50



キシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシが挙げられる。アラルキルオキシとしては、例えば、ベンゾイルオキシ、フェネチルオキシ、ナフチルメチルオキシ、ナフチルエチルオキシが挙げられる。

## 【0153】

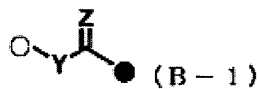
生体直交性官能基を含まない2価の基はまた、反応に対して高度に不活性な基であってもよい。したがって、このような2価の基は、炭素原子および水素原子のみから構成される基であってもよい。このような2価の基は、アルキレン、シクロアルキレン、またはアリール、およびこれらの2以上の組み合わせ（例えば2または3）である。生体直交性官能基を含まない2価の基が反応に対して高度に不活性な基である場合、このような2価の基は、反応に対して高度に不活性な置換基として、アルキレン、シクロアルキレン、およびアリールからなる群より選ばれる置換基を有していてもよい。反応に対して高度に不活性な置換基の数は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個である。

10

## 【0154】

特定の実施形態では、Bは、下記式(B-1)：

## 【化21】



〔式中、

Yは、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または下記式(B-2)：

## 【化22】



〔式中、

VおよびV'は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または単結合であり、

V1は、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

30

sは、0～10の任意の整数であり、

式(B-2)における および は、それぞれ、式(B-1)における および と同じ配向である。)であり、

Zは、酸素原子、硫黄原子、または水素原子(Zが水素原子である場合、-C(=Z)-は、-CH<sub>2</sub>-を示す。)であり、

式(B-1)における (白丸)は、L側の部分に対する結合を示し、(黒丸)はR側の部分に対する結合を示す。)で表されてもよい。

## 【0155】

Yは、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または上記式(B-2)で表される基である。構造の簡便化等の観点から、Yは、-NH-、-O-、または-CH<sub>2</sub>-であってもよい。あるいは、炭素原子を基調とした構造の設計等の観点からは、Yは、-CH<sub>2</sub>-、または上記式(B-2)で表される基であってもよい。

40

## 【0156】

Zは、酸素原子、硫黄原子、または水素原子であるが、好ましくは酸素原子または硫黄原子である。

## 【0157】

VおよびV'は、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または単結合であり、好ましくは-CH<sub>2</sub>-、または単結合である。

## 【0158】

V1は、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を

50

まない2価の基である。このような2価の基は、上述したものと同様である。

【0159】

好ましくは、V1における2価の基は、置換されていてもよい2価の炭化水素基、または置換されていてもよい2価の複素環基である。2価の炭化水素基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様であるが、V1の場合、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、アリーレンが好ましい。例えば、生体直交性官能基を含有する部分で置換されていない場合、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレンが好ましい。一方、生体直交性官能基を含有する部分で置換されている場合、アルキレン、シクロアルキレン、アリーレンが好ましい。これらの基の例および好ましい例は、上述したとおりである。2価の複素環基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様であるが、V1の場合、5員または6員の複素環基が好ましい。5員または6員の複素環基の例および好ましい例は、上述したものと同様である。置換基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。V1は、(a)生体直交性官能基を、例えば1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1個または2個、さらにより好ましくは1個有していてもよい。2価の基に含まれる生体直交性官能基の数が複数である場合、複数の生体直交性官能基は、同種であっても異種であってもよい。単純な構造の採用、および反応性の向上等の観点では、同種であることが好ましい。差別化された反応の確保等の観点では、異種であることが好ましい。V1はまた、(b)置換基を1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1もしくは2個を有していてもよい。

10

20

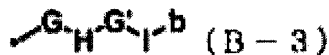
【0160】

sは、0~10の任意の整数であり、好ましくは0~8の整数であり、より好ましくは0~6の整数であり、さらにより好ましくは0~4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。

【0161】

さらに特定の実施形態では、V1は、下記式(B-3)：

【化23】



(式中、

GおよびG'は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、単結合、または下記式(B-4)：

【化24】



(式中、

WおよびW'は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または単結合であり、

40

W1は、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

tは、0~10の任意の整数である。

式(B-4)における(白丸)は、式(B-3)における結合手(・)の方向に対する結合を示し、(黒丸)はb側の方向に対する結合を示す。)で表される基であり、

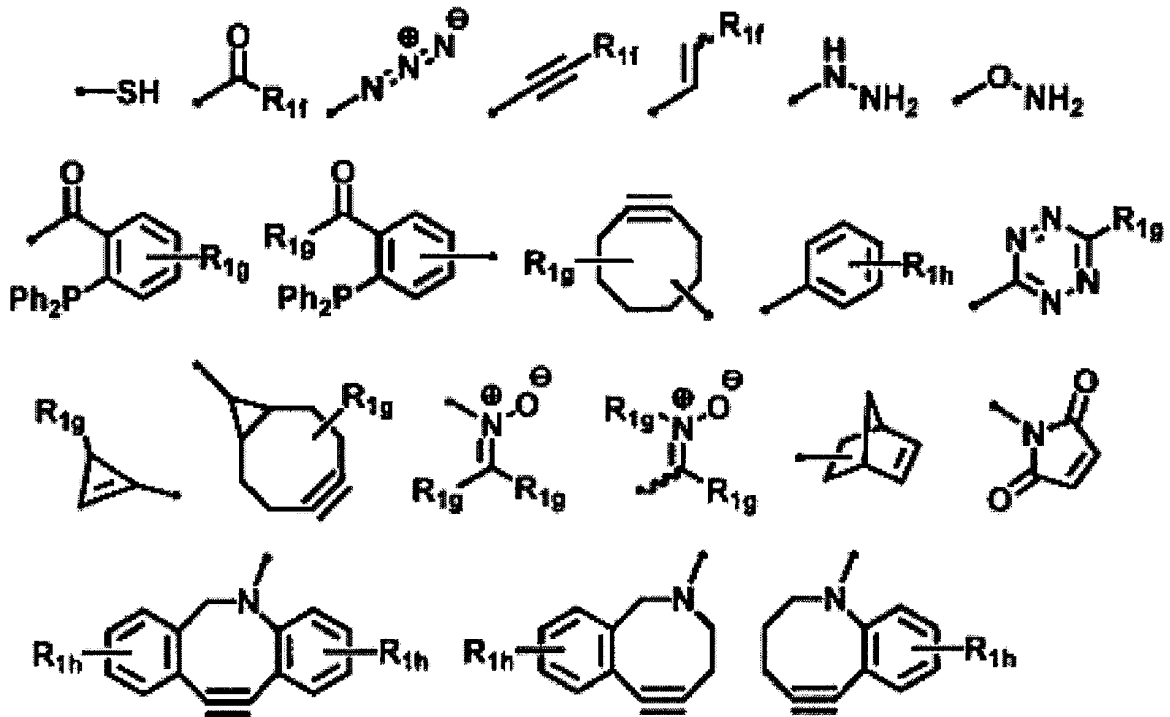
Hは、-CH<sub>2</sub>-、-C=O-、-C=S-、-NH-、または単結合であり、

Iは、2価の炭化水素基、2価の複素環、または単結合であり、

bは、下記：

50

## 【化25】



10

20

(式中、

R<sub>1f</sub>、単一もしくは複数のR<sub>1g</sub>および単一もしくは複数のR<sub>1h</sub>は、同一もしくは異なって、前記(i)~(vii)からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。)で表されるいずれか一つの基である。)で表される基を側鎖として有する2価の基であってもよい。このような2価の基は、2価の炭化水素基、または2価の複素環基であり、好ましくは、置換されていてよい2価の炭化水素基であり、より好ましくは、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、またはアリーレンであり、さらにより好ましくは、アルキレン、シクロアルキレン、またはアリーレンであり、特に好ましくはアルキレンである。これらの基の例および好ましい例は、上述したとおりである。これらの基は、上記側鎖以外の置換基で置換されていてよい。このような置換基の数は、1~5個、好ましくは1~3個、より好ましくは1もしくは2個である。置換基の例および好ましい例は、上述したとおりである。

30

## 【0162】

GおよびG'は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、単結合、または上記式(B-4)で表される基である。構造の簡便化等の観点から、GおよびG'は、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または単結合であってもよい。あるいは、炭素原子を基調とした構造の設計等の観点からは、GおよびG'は、-CH<sub>2</sub>-、単結合、または上記式(B-4)で表される基であってもよい。

40

## 【0163】

Hは、-CH<sub>2</sub>-、-C=O-、-C=S-、-NH-、または単結合である。好ましくは、Hは、-CH<sub>2</sub>-、または単結合である。

## 【0164】

Iは、2価の炭化水素基、2価の複素環、または単結合である。2価の炭化水素基、および2価の複素環は、置換基で置換されていてよい、置換されていなくてもよい。2価の炭化水素基、2価の複素環、および置換基の定義、例および好ましい例は、V1において上述したものと同様である。

## 【0165】

50

WおよびW'は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、または単結合であり、好ましくは-CH<sub>2</sub>-、または単結合である。

【0166】

W1は、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基である。このような2価の基は、上述したものと同様である。

【0167】

tは、0~10の任意の整数であり、好ましくは0~8の整数であり、より好ましくは0~6の整数であり、さらにより好ましくは0~4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。

【0168】

1-5. 反応性基(R)

式(I)において、Rは、抗体に対する反応性基である。このような反応性基は、当該技術分野において技術常識である。

【0169】

反応性基は、生体直交性官能基と同種または異種の基である。

【0170】

例えば、Bが、(a)生体直交性官能基を含む2価の基である場合、反応性基は、その生体直交性官能基と異種の基であってもよい。反応性基が生体直交性官能基と同種の基であれば、抗体に対する反応性基の反応特異性が確保されないためである。また、そもそも生体直交性官能基は、抗体を構成する天然の20種のアミノ酸残基の側鎖と反応し得ない基のためである。

【0171】

より具体的には、タンパク質を構成する上述したような天然の20種のアミノ酸のうち、側鎖がないグリシン、ならびに側鎖が炭化水素基であるアラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、およびバリンは、通常反応に対して不活性である。したがって、タンパク質に対する反応性基は、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンからなる14種のアミノ酸のいずれか1種または2種以上(例、2種、3種、4種)の側鎖に対して反応できる基である。タンパク質のアミノ酸組成等の条件に応じて、1種または2種以上(例、2種、3種、4種)の反応性基が式(I)で表される化合物に含まれていてもよいが、好ましくは、1種の反応性基が式(I)で表される化合物に含まれていてもよい。

【0172】

好ましくは、反応性基は、タンパク質を構成する上述したような14種のアミノ酸のうちのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と反応できる基である。

【0173】

より好ましくは、反応性基は、リジン、チロシン、トリプトファン、またはシステインのいずれか1種のアミノ酸の側鎖に対して特異的な反応性基であってもよい。

【0174】

さらにより好ましくは、反応性基は、リジン、チロシン、またはトリプトファンのいずれか1種のアミノ酸の側鎖に対して特異的な反応性基であってもよい。

【0175】

また、タンパク質がヒトIgG1等のヒトIgGである場合、反応性基は、リジンまたはチロシンの側鎖に対して特異的な反応性基であることが好ましい。

【0176】

リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、リジン残基の側鎖中に存在するアミノ基(NH<sub>2</sub>)と特異的に反応できる基であり、例えば、活性化エステル残基(例、N-ヒドロキシスクシンイミド残基)、ビニルスルホン残基、スルホニルクロライド残基、イソシアネート残基、イソチオシアネート残基、アルデヒド残基、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸残基、2-イミノ-2-メトキシエ

10

20

30

40

50

チル残基、ジアゾニウムテレフタル酸残基が挙げられる。

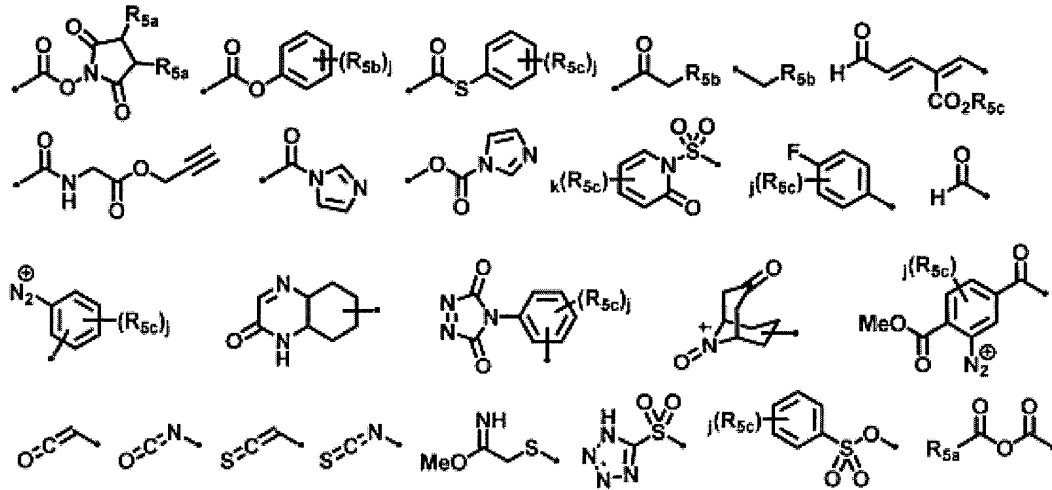
【0177】

リジン残基の側鎖に対して特異的な上述の反応性基と、リジン残基の側鎖中に存在するアミノ基 ( $\text{NH}_2$ ) との間の反応により生成する連結部分としては、例えば、アミド残基、ウレア残基、ピリジン残基、カルバメート残基、スルホンアミド残基が挙げられる。

【0178】

より具体的には、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【化26】



10

20

〔ここで、

$\text{R}_{5a}$  および  $\text{R}_{5c}$  は、水素原子、または上述した置換基であり、

$\text{R}_{5b}$  は、電子吸引基であり、

$j$  は、1 ~ 5 の任意の整数であり、

$k$  は、1 ~ 4 の任意の整数である。〕

【0179】

$\text{R}_{5a}$  および  $\text{R}_{5c}$  は、水素原子、または上述した置換基である。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したものと同様である。

30

【0180】

$\text{R}_{5b}$  は、電子吸引基である。このような電子吸引基としては、例えば、上述したものが挙げられるが、ハロゲン原子、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレートが好ましい。

【0181】

$j$  は、1 ~ 5 の任意の整数であり、好ましくは 1 ~ 3 の整数であり、より好ましくは 1 または 2 である。

【0182】

$k$  は、1 ~ 4 の任意の整数であり、好ましくは 1 ~ 3 の整数であり、より好ましくは 1 または 2 である。

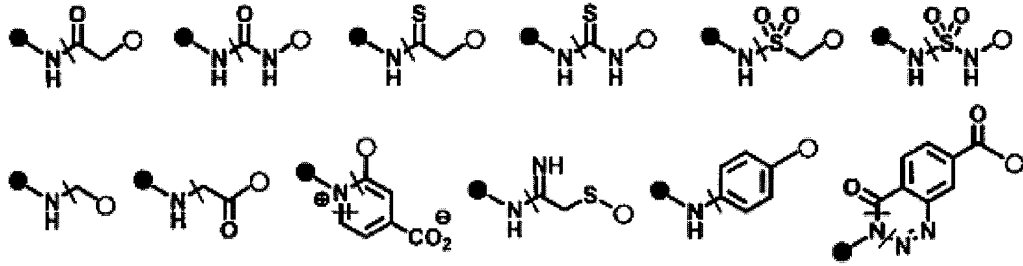
40

【0183】

リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である上記化学構造と、リジン残基の側鎖中に存在するアミノ基 ( $\text{NH}_2$ ) との間の反応により生成する連結部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

50

## 【化 2 7】



〔ここで、(黒丸)は、T側の部分に対する結合を示し、(白丸)は、B側の部分に対する結合を示す。結合に直交する直線は、反応により生成する結合を示す。〕

10

## 【0184】

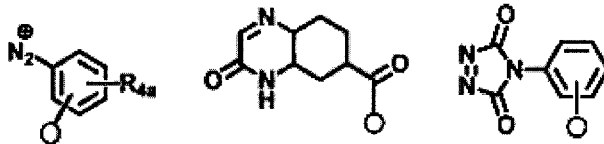
チロシン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、チロシン残基の側鎖中に存在するフェノール性ヒドロキシル基(OH)のオルト位の原子と特異的に反応できる基であり、例えば、ジアゾニウム残基、ジアゾジカルボキレート残基、2,3-ジヒドロ-1H-ピラジン-6-オン残基が挙げられる。

## 【0185】

より具体的には、チロシン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

## 【化 2 8】

20



〔ここで、R<sub>4a</sub>は、水素原子、または上述した置換基であり、は、Bに対する結合を示す。〕

## 【0186】

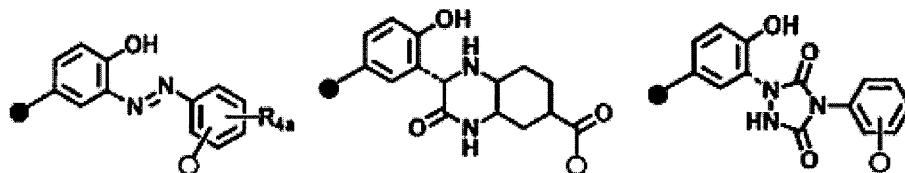
R<sub>4a</sub>は、水素原子、または上述した置換基である。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したものと同様である。

30

## 【0187】

チロシン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である上記化学構造と、チロシン残基の側鎖中に存在するフェノール性ヒドロキシル基(OH)のオルト位の原子との間の反応により生成する連結部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

## 【化 2 9】



40

〔ここで、R<sub>4a</sub>は、水素原子、または上述した置換基であり、は、Tに対する結合を示し、は、Bに対する結合を示す。〕

## 【0188】

R<sub>4a</sub>は、水素原子、または上述した置換基である。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したものと同様である。

## 【0189】

トリプトファン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、トリプトファン残基の側鎖中に存在するインドール基の3位の環構成原子と特異的に反応できる基であり、例えば、9

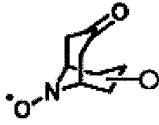
50

- アザビシクロ [ 3 . 3 . 1 ] ノナン - 3 - オン - N - オキシル残基が挙げられる。

【 0 1 9 0 】

より具体的には、トリプトファン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【 化 3 0 】



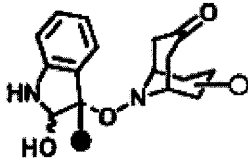
【ここで、 は、 B に対する結合を示す。】

10

【 0 1 9 1 】

トリプトファン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である上記化学構造と、トリプトファン残基の側鎖中に存在するインドール基の 3 位の環構成原子との間の反応により生成する連結部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【 化 3 1 】



20

【ここで、 は、 T に対する結合を示し、 は、 B に対する結合を示す。】

【 0 1 9 2 】

特に好ましくは、反応性基は、リジンの側鎖に対して特異的な反応性基であってもよい。

【 0 1 9 3 】

1 - 6 . 部分構造「 L - B 」

1 - 6 - 1 . A および R を連結する部分構造「 L - B 」中の主鎖の長さ

式 ( I ) において、 A ( 親和性物質 ) および R ( 反応性基 ) を連結する主鎖 ( L - B 中の直鎖部分 ) の長さは、抗体および親和性物質の種類、ならびに抗体における親和性物質の標的部位と、 R が反応して結合すべきである、上述したような標的領域 ( 例、特定の位置 ) 中の特定のアミノ酸残基の位置および数との関係などの種々の因子に応じて、適宜設計することができる。式 ( I ) で表される化合物は、親和性物質が抗体に会合し、次いで、 L - B を介して親和性物質と共有結合している反応性基が、上記標的部位の近傍に存在する特定のアミノ酸残基の側鎖中の基 ( 例、リジン残基の側鎖中のアミノ基 ) と反応することにより、抗体と共有結合することができる。このとき、 R が反応して結合すべきである特定のアミノ酸残基の近傍領域、上記標的部位の近傍領域、および当該特定のアミノ酸残基と上記標的部位との間の領域において当該特定のアミノ酸残基が他に存在しない場合、主鎖の長さを厳密に制御せずとも、反応性基は、当該特定のアミノ酸残基に対して位置選択的に結合することができる。勿論、このような領域において当該特定のアミノ酸残基が他に存在する場合であっても、主鎖の長さを制御することにより、反応性基は、当該特定のアミノ酸残基に対して位置選択的に結合することができる。

30

40

【 0 1 9 4 】

A および R を連結する主鎖の長さは、抗体およびそれに対する親和性物質の種類、ならびに抗体中の標的部位中の特定のアミノ酸残基の位置および数の関係などの因子に応じて変動し得るが、約 5 以上、好ましくは約 7 . 5 、より好ましくは約 1 0 . 5 以上であってもよい。このような主鎖の長さはまた、例えば約 3 0 以下、好ましくは約 2 3 以下、より好ましくは約 1 6 . 5 以下であってもよい。より具体的には、このような主鎖の長さは、例えば約 5 . 0 ~ 3 0 、好ましくは約 7 . 5 ~ 2 3 、より好ましくは約 1 0 . 5 ~ 1 6 . 5 であってもよい。

【 0 1 9 5 】

50

ところで、原子間の長さ（距離）の関係については、下表のとおりであることが、当該技術分野における技術常識である。したがって、当業者であれば、下表の原子間の長さを参考にして、上述したような主鎖の長さ（ ）に対応する個数の原子を有する主鎖を適宜設計することができる。

【 0 1 9 6 】

【表 1】

表 1. 直鎖アルキレンにおける両末端の炭素原子間の長さ（距離）の関係

	長さ (Å)
直鎖アルキレン	
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (C 2)	約 1.5
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (C 3)	約 3.0
C 4	約 4.5
C 5	約 6.0
C 6	約 7.5
C 7	約 9.0
C 8	約 10.5
C 9	約 12.0
C 10	約 13.5
直鎖アルケニレン	
CH=CH	約 1.5

10

20

【 0 1 9 7 】

より具体的には、A および R を連結する主鎖の長さは、主鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。主鎖を構成する原子数は、例えば 4 個（約 5.0 ）以上、好ましくは 6 個（約 7.5 ）、より好ましくは 8 個（約 10.5 ）以上であってもよい。主鎖の原子数はまた、例えば 20 個（約 30 ）以下、好ましくは 16 個（約 23 ）以下、より好ましくは 12 個（約 16.5 ）以下であってもよい。より具体的には、主鎖の原子数は、例えば 4 ~ 20 個、好ましくは 6 ~ 16 個、より好ましくは 8 ~ 12 個であってもよい。

【 0 1 9 8 】

主鎖が環構造を含まない構造である場合、主鎖の原子数は、鎖状構造中の原子数を数えることにより決定することができる。

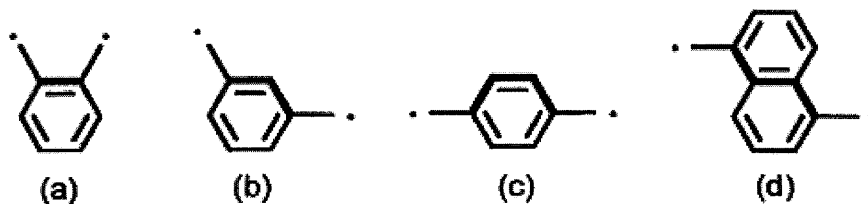
30

【 0 1 9 9 】

一方、主鎖が環構造を含む構造である場合、主鎖の原子数と上述した長さとは必ずしも対応せず、主鎖の原子数により規定され得る長さは、上述した長さよりも短くなる傾向がある。このような場合であっても、主鎖の長さを規定する観点から、主鎖の原子数を便宜的に数えることができる。具体的には、このような場合における主鎖の原子数は、主鎖において 2 価の環構造を含まない鎖状構造中の原子数に加えて、環構造中の 2 つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定することができる（例えば、以下（a）~（d）の太字経路を参照）。

【化 3 2】

40



・ は、結合手である。

（ a ） の場合、最短経路は太字経路であるため、主鎖の原子数として数えられる 2 価の環構造中の原子数は、2 である。

50



(b) の場合、最短経路は太字経路であるため、主鎖の原子数として数えられる 2 価の環構造中の原子数は、3 である。

(c) の場合、いずれの経路も最短経路 (等距離) であるため、主鎖の原子数として数えられる 2 価の環構造中の原子数は、4 である。

(d) の場合、縮合部位の経路が最短経路であるため、主鎖の原子数として数えられる 2 価の環構造中の原子数は、4 である。

【0200】

好ましくは、L - B で表される A と R との連結部分 (側鎖を除く) は、2 価の環構造を含まない鎖状構造であってもよい。この場合、L - B で表される A と R との連結鎖部分において 2 価の環基が含まれないように L および B を適宜設計することができる。

10

【0201】

1 - 6 - 2 . 部分構造「L - B」の具体的構造

上記式 (I) において、L および B は、互いに関連し得る構造である。したがって、上記式 (I) において、L および B は、「L - B」で表される部分構造として規定することができる。

【0202】

一実施形態では、切断性リンカーは、(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー、もしくは (ii) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであってもよい。

20

【0203】

特定の実施形態では、L が上記 (i) の切断性リンカーである場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基である。

【0204】

好ましくは、L が上記 (i) の切断性リンカーである場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。この場合、(i) において生成される生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、(i) において生成される生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、2 種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保、および反応における一部の生体直交性官能基の不利用等の観点では、(i) において生成される生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と異種であってもよい。

30

【0205】

あるいは、L が上記 (i) の切断性リンカーである場合、B は、(b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であってもよい。この場合、式 (I) で表される化合物またはその塩は、より単純な構造を有することになるので、合成が容易である。

【0206】

別の特定の実施形態では、L が上記 (ii) の切断性リンカーである場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。

【0207】

特定の実施形態では、L - B で表される部分構造は、好ましくは、ペプチド部分を含まない。この場合、本発明の化合物を用いて得られる本発明の機能性物質を有する抗体 (例、抗体薬物複合体) は、免疫原性を有し得るペプチド部分をリンカーとして含み得ないという利点がある。

40

【0208】

特定の実施形態では、「L - B」で表される部分構造は、A および R を連結する主鎖 (L - B 中の直鎖部分) の中心位置に存在する原子 (例、主鎖を構成する原子数が奇数の場合)、または当該主鎖の中心位置に存在する結合部位 (例、主鎖を構成する原子数が偶数の場合) を基準として、対称構造 (例、シス型 (すなわち、Z)、トランス型 (すなわち、E)) を有していてもよい。例えば、中心位置に存在する結合部位を、上述したような

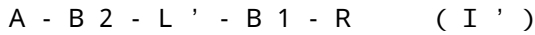
50

切断リンカー中の切断性部分として設計することもできる。「L - B」で表される部分構造が対称構造を有する場合、「L - B」で表される部分構造は、容易に合成することができる。例えば、反応して切断性部分を形成できる官能基を一方の末端に有する同じ2価の基（例、SH基を一方の末端に有する鎖状の2価の基）を互いに反応させることにより、主鎖の中心位置に切断性部分を含む対称構造（鎖状の2価の基 - S - S - 鎖状の2価の基）を実現することができる。

## 【0209】

したがって、「L - B」で表される部分構造は、「B2 - L' - B1」で表される部分構造（すなわち、Lが、B2 - L'で表される2価の基であり、BがB1である。）であってもよい。この場合、上記式（I）で表される化合物は、下記式（I'）で表される化合物として規定することができる。

10



〔式中、

AおよびRは、前記式（I）のものと同じであり

L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B1およびB2は、同一または異なって、（a）生体直交性官能基を含む2価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

B1およびB2は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕

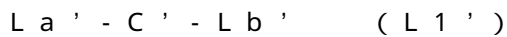
## 【0210】

B1およびB2は、同一または異なって、Bの定義、例および好ましい例と同様である。

20

## 【0211】

特定の実施形態では、L'は、下記式（L1'）～（L3'）のいずれか一つで表されてもよい：



〔式中、

La'およびLb'は、それぞれ、2価の基であり、

C'は、切断性部分である。〕

## 【0212】

30

La'およびLb'で表される2価の基は、それぞれ、La'およびLb'で表される2価の基の定義、例および好ましい例と同様である。

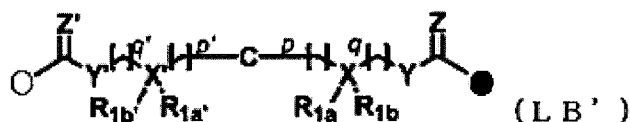
## 【0213】

C'で表される切断性部分は、Cで表される切断性部分の定義、例および好ましい例と同様である。

## 【0214】

別の特定の実施形態では、L - Bで表される構造単位は、下記式（LB'）で表されてもよい。

## 【化33】



40

〔式中、

C、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1a'、R1b'、R1b、Y、Y'、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

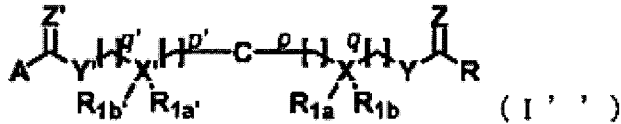
（白丸）は、Aに対する結合を示し、（黒丸）は、Rに対する結合を示す。〕

## 【0215】

したがって、上記式（I）は、下記式（I''）として規定することができる。

50

【化34】



〔式中、

A、R、C、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1b、R1a、R1b、Y、Y'、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。]

【0216】

上記式(LB')および(I')において、C=ZにおけるC(炭素原子)からC=Z'に10  
 におけるC(炭素原子)までの長さは、AおよびRを連結する主鎖の長さと同様である。こ  
 れらの式において、C=ZにおけるCからC=Z'におけるCまでの長さはまた、C=Zに  
 におけるCからC=Z'におけるCを連結する部分構造の連結鎖(水素原子および置換基を除  
 く)を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、AおよびRを  
 連結する主鎖を構成する原子数と同様である。C=ZにおけるCからC=Z'におけるCを  
 連結する部分構造の連結鎖(水素原子および置換基を除く)は、環構造を含んでいなく  
 ても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖(水素原子お  
 よび置換基を除く)は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

【0217】

1-7. 製造方法

20

抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩は、適  
 宜調製することができる。抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化  
 合物は、式(I)、好ましくは式(I')、より好ましくは式(I'')で表される。

【0218】

親和性物質としては、任意の官能基を有するものを適宜選択することができる。したが  
 って、当該官能基と反応することができる反応性基を利用することにより、親和性物質を  
 、L-B-Rで表される構造単位、またはR-L-B-Rで表される構造単位(2つの反  
 応性基は同一または異なる)と反応させて、A-L-B-Rで表される構造単位を調製す  
 ることができる。例えば、このような反応は、適切な反応系、例えば有機溶媒系または水  
 溶液系において、適温(例、約15~200)で行うことができる。反応系は、適切な  
 触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分~20時間、好ましくは10分~15  
 時間、より好ましくは20分~10時間、さらにより好ましくは30分~8時間である。

30

【0219】

反応系において、親和性物質(X)に対する、L-B-Rで表される構造単位、または  
 R-L-B-Rで表される構造単位(Y)のモル比率(Y/X)は、当該構造単位および  
 親和性物質の種類、当該構造単位によって修飾されるべき親和性物質中の部位の数等に  
 応じて変動することから特に限定されないが、例えば0.1~50であり、好ましくは0.  
 5~40であり、より好ましくは1~35であり、さらにより好ましくは2~25であり  
 、特に好ましくは3~15である。

【0220】

40

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の生成の確認は、  
 その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラ  
 フィー(例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラム  
 クロマトグラフィー、HPLC)、または質量分析により、好ましくは、質量分析により  
 行うことができる。抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩  
 は、クロマトグラフィー(例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロ  
 マトグラフィー)等の任意の方法により適宜精製することができる。

【0221】

1-8. その他

後述の発明〔例、式(II)~(v)およびその下位概念の式、ならびに部分構造式(

50

例、(L1)~(L3)、(La')、(Lb')、(B-1)~(B-4))で表される発明)では、任意の記号(例、A、L、B、R)、当該記号で表される用語、およびそれらの詳細(例えば、定義、例および好ましい例)は、上記式(I)で表される化合物またはその塩の発明と共通する。また、後述の発明を規定することができる特定の部分(例、切断性部分、切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する部分)、特定の基(例、生体直交性官能基、2価の基、アルキル基、置換基、電子吸引基)、および特定の数値、ならびに塩等の任意の技術要素(例、定義、例および好ましい例)についても、上記で説明したものと共通にすることができる。したがって、これらの事項は、特に言及することなく、後述の発明において適宜援用することができる。同様に、後述の発明で述べた特定の発明の技術要素は、本発明および他の発明の技術要素として、適宜援用することができる。

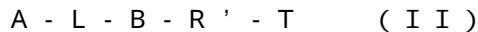
10

## 【0222】

2. 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩

## 2-1. 概要

本発明は、式(II)で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を提供する。



[式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。]

20

## 【0223】

2-2. 抗体と反応性基との間の反応により生成する部分(R')

抗体と反応性基との間の反応により生成する部分において、抗体および反応性基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。抗体と反応性基との間の反応により生成する部分は、当該技術分野において技術常識であり、抗体および反応性基の種類に応じて適宜決定することができる。

30

## 【0224】

好ましくは、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分は、抗体に含まれ得る14種のアミノ酸(アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジン)のうちのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対する反応性基との間の反応により生成する部分である。

## 【0225】

より好ましくは、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジン、チロシン、トリプトファン、またはシステインのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい。

40

## 【0226】

さらに好ましくは、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジン、チロシン、またはトリプトファンのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい。リジン、チロシン、またはトリプトファンのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分としては、例えば、上記「1-5. 反応性基(R)」で述べた連結部分および/または化学構造が挙げられる。

## 【0227】

さらに一層好ましくは、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジンまたはチロシンの側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する

50

部分であってもよい（特に、抗体がヒトIgG1等のヒトIgGである場合）。リジンまたはチロシンの側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分としては、例えば、上記「1-5. 反応性基(R)」で述べた連結部分および/または化学構造が挙げられる。

【0228】

特に好ましくは、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジンの側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい。

【0229】

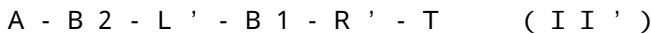
2-3. 部分構造「L-B」

部分構造「L-B」の詳細は、上記「1-6. 部分構造「L-B」」で述べたとおりである。

10

【0230】

特定の実施形態では、「L-B」で表される部分構造は、「B2-L'-B1」で表される部分構造（すなわち、Lが、B2-L'で表される2価の基であり、BがB1である。）であってもよい。この場合、上記式(II)で表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩は、下記式(II')で表されることができる。



〔式中、

A、R'およびTは、前記式(II)のものと同じであり

L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

20

B1およびB2は、同一または異なって、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

B1およびB2は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕

【0231】

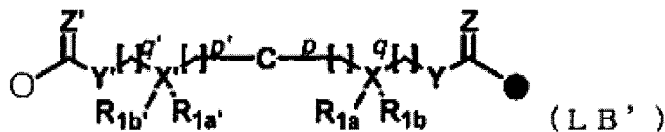
上記式(II')において、L'は、上述した式(L1')~(L3')のいずれか一つで表されてもよい。

【0232】

別の特特定の実施形態では、L-Bで表される構造単位は、下記式(LB')で表されてもよい。

【化35】

30



〔式中、

C、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1a、R1b、R1b、Y、Y'、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

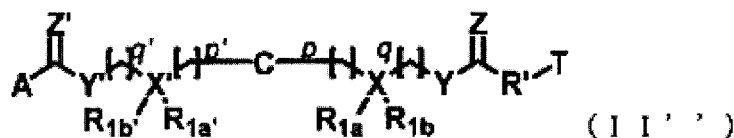
(白丸)は、Aに対する結合を示し、(黒丸)は、R'に対する結合を示す。〕

【0233】

したがって、上記式(II)は、下記式(II'')として規定することができる。

40

【化36】



〔式中、

A、R'、T、C、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1b、R1a、R1b、Y、Y'、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。〕

【0234】

50

上記式 (LB') および (II'') において、C = Z における C (炭素原子) から C = Z' における C (炭素原子) までの長さは、上述したような A および R を連結する主鎖の長さと同様である。これらの式において、C = Z における C から C = Z' における C までの長さはまた、C = Z における C から C = Z' における C を連結する部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、A および R を連結する主鎖を構成する原子数と同様である。C = Z における C から C = Z' における C を連結する部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

10

## 【0235】

## 2-4. 抗体が有する、抗体以外の部分構造の結合部位 (位置選択性)

抗体以外の部分構造 (例、A-L-B-R') は、抗体 (T) における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。

## 【0236】

本明細書において、「位置選択的」または「位置選択性」とは、抗体において特定のアミノ酸残基が特定の領域に偏在していないにもかかわらず、抗体中の特定のアミノ酸残基と結合できる所定の構造単位が、抗体中の特定の領域に偏在することをいう。したがって、「位置選択的に有する」、「位置選択的な結合」、「位置選択性での結合」等の位置選択性に関連する表現は、1個以上の特定のアミノ酸残基を含む標的領域における所定の構造単位の保有率または結合率が、標的領域における当該特定のアミノ酸残基と同種である複数個のアミノ酸残基を含む非標的領域における当該構造単位の保有率または結合率よりも有意なレベルで高いことを意味する。このような位置選択的な結合または保有は、抗体中の特定のアミノ酸残基に対して所定の構造単位をランダムに反応させるのではなく、抗体中の標的領域における特定のアミノ酸残基に対して所定の構造単位を優先的に反応させることができる本発明により達成することができる。

20

## 【0237】

具体的には、T が、連続する 1 ~ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む場合、抗体以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

30

## 【0238】

## 2-5. 抗体が有する、抗体以外の部分構造の個数

抗体 (T) が保有する、抗体以外の部分構造 (例、A-L-B-R') の個数は、変動することができる。例えば、T が複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、T は、複数個の単量体タンパク質中の対応する複数個の標的領域において、T 以外の部分構造を有することができる。その結果、T は、T 以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式 (II)、(II')、または (II'') で表される構造は、T が、T 以外の部分構造を 1 個または複数個有していてもよいことを示す。T が有する、T 以外の部分構造の個数は、抗体の種類、および抗体とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、抗体の種類によっても異なるが、例えば 1 ~ 8、好ましくは 1 ~ 4、より好ましくは 1 または 2 であってもよい。

40

## 【0239】

特定の実施形態では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、抗体が、複数個の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数個の単量体タンパク質の同一標的領域に対して抗体以外の部分構造を複数個導入することができる。

50

## 【0240】

好ましい実施形態では、抗体は、複数個の重鎖を含む抗体であってもよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。重鎖の個数は、抗体の種類によって異なる。例えば、IgG、IgE、およびIgDは、2個の重鎖を有することができる。IgAは、2個または4個の重鎖を有することができる。IgMは、8個の重鎖を有することができる。抗体（抗体）が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、DARと同義のものとして考慮することができる。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、IgG、IgE、およびIgDについては1個または2個（好ましくは2個）であり、IgAについては1～4個（好ましくは4個）であり、IgMについては1～8個（好ましくは8個）であってもよい。

10

## 【0241】

## 2-6. 製造方法

本発明は、以下を含む、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の製造方法を提供する：

(A1) 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を抗体と反応させて、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を生成すること。

## 【0242】

抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物は、式(I)、好ましくは式(I')、より好ましくは式(I'')で表される。抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体は、式(II)、好ましくは式(II')、より好ましくは式(II'')で表される。

20

## 【0243】

抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩は、反応性基を有するため、抗体と反応することができる。このような反応は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。例えば、このような反応は、適切な反応系、例えば緩衝液中において、室温（例、約15～30）で行うことができる。緩衝液のpHは、例えば5～9であり、好ましくは5.5～8.5であり、より好ましくは6.0～8.0である。緩衝液は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。このような反応の詳細については、例えば、G. J. L. Bernardes et al., Chem. Rev., 115, 2174 (2015); G. J. L. Bernardes et al., Chem. Asian J., 4, 630 (2009); B. G. Davies et al., Nat. Commun., 5, 4740 (2014); A. Wagner et al., Bioconjugate Chem., 25, 825 (2014)を参照のこと。

30

## 【0244】

反応系において、抗体(X)に対する、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩(Y)のモル比率(Y/X)は、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物および抗体の種類、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物によって修飾されるべき抗体中の部位の数（例、DAR）等に応じて変動することから特に限定されないが、例えば0.1～100であり、好ましくは0.5～80であり、より好ましくは1～70であり、さらにより好ましくは2～50であり、特に好ましくは3～30である。

40

## 【0245】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により

50

行うことができる。位置選択性の確認は、例えば、ペプチドマッピングにより行うことができる。ペプチドマッピングは、例えば、プロテアーゼ（例、トリプシン、キモトリプシン、）処理および質量分析により行うことができる。プロテアーゼとしては、エンドプロテアーゼが好ましい。このようなエンドプロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、G l u - C、L y s - N、L y s - C、A s p - Nが挙げられる。抗体が有する、抗体以外の部分構造の個数の確認は、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

10

【0246】

3. 抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩

## 3-1. 概要

本発明は、式（I I I）で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を提供する。

$$A - L - B' (-F) - R' - T \quad (I I I)$$

〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。〕で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩。

20

【0247】

式（I I I）または他の式において、R'は、Fではなく、B'に共有結合している。

【0248】

## 3-2. 機能性物質（F）

機能性物質としては、抗体に任意の機能を付与する物質である限り特に限定されず、例えば、薬物、標識物質、安定化剤が挙げられるが、好ましくは薬物または標識物質である。機能性物質はまた、単一の機能性物質であってもよく、または2以上の機能性物質が連結された物質であってもよい。

30

【0249】

薬物としては、任意の疾患に対する薬物であってもよい。このような疾患としては、例えば、癌（例、肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肝臓癌、甲状腺癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮癌、骨癌、皮膚癌、脳腫瘍、黒色腫）、自己免疫疾患・炎症性疾患（例、アレルギー疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス）、脳神経疾患（例、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症）、感染症（例、細菌感染症、ウイルス感染症）、遺伝性・希少疾患（例、遺伝性球状赤血球症、非ジストロフィー筋緊張症）、眼疾患（例、加齢黄斑変性症、糖尿病網膜症、網膜色素変性症）、骨・整形外科領域の疾患（例、変形性関節症）、血液疾患（例、白血病、紫斑病）、その他の疾患（例、糖尿病、高脂血症等の代謝異常症、肝臓疾患、腎疾患、肺疾患、循環器系疾患、消化器系疾患）が挙げられる。抗体が所定の疾患の標的タンパク質に対する抗体である場合、薬物は、当該所定の疾患に関連する薬物（例、当該所定の疾患を治療する薬物、当該所定の疾患の標的タンパク質に対する抗体の使用に伴う副作用を緩和する薬物）であってもよい。

40

【0250】

より具体的には、薬物は、抗癌剤である。抗癌剤としては、例えば、化学療法剤、毒素

50



、放射性同位体またはそれを含む物質が挙げられる。化学療法剤としては、例えば、DNA 損傷剤、代謝拮抗薬、酵素阻害剤、DNA インターカレート剤、DNA 切断剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNA 結合阻害剤、チューブリン結合阻害剤、細胞傷害性ヌクレオシド、白金化合物が挙げられる。毒素としては、例えば、細菌毒素（例、ジフテリア毒素）、植物毒素（例、リシン）が挙げられる。放射性同位体としては、例えば、水素原子の放射性同位体（例、 $^3\text{H}$ ）、炭素原子の放射性同位体（例、 $^{14}\text{C}$ ）、リン原子の放射性同位体（例、 $^{32}\text{P}$ ）、硫黄原子の放射性同位体（例、 $^{35}\text{S}$ ）、イットリウム放射性同位体（例、 $^{90}\text{Y}$ ）、テクネチウム放射性同位体（例、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、インジウム放射性同位体（例、 $^{111}\text{In}$ ）、ヨウ素原子の放射性同位体（例、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、サマリウム放射性同位体（例、 $^{153}\text{Sm}$ ）、レニウム放射性同位体（例、 $^{186}\text{Re}$ ）、アスタチン放射性同位体（例、 $^{211}\text{At}$ ）、ビスマス放射性同位体（例、 $^{212}\text{Bi}$ ）が挙げられる。更に具体的には、薬物として、オーリスタチン（MMAE、MMAF）、メイタンシン（DM1、DM4）、PBD（ピロロベンゾジアゼピン）、IGN、カンプトテシン類縁体、カリケアミシン、デュオカルミシン、エリブリン、アントラサイクリン、dmDNA31、ツブリシンが挙げられる。

10

## 【0251】

標識物質としては、例えば、酵素（例、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ）、親和性物質（例、ストレプトアビジン、ピオチン、ジゴキシゲニン、アプタマー）、蛍光物質（例、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質）、発光物質（例、ルシフェリン、エクオリン、アクリジニウムエステル、トリス（2,2'-ビピリジル）ルテニウム、ルミノール）、放射性同位体（例、上述したもの）またはそれを含む物質が挙げられる。

20

## 【0252】

機能性物質はまた、高分子化合物、中分子化合物、または低分子化合物であり、好ましくは、低分子化合物である。低分子化合物とは、分子量1500以下の化合物をいう。低分子化合物は、天然化合物または合成化合物である。低分子化合物の分子量は、1200以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、または300以下であってもよい。低分子化合物の分子量はまた、30以上、40以上、または50以上であってもよい。低分子化合物は、上述したような薬物または標識物質であってもよい。また、低分子化合物としては、例えば、アミノ酸、オリゴペプチド、ビタミン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、単糖、オリゴ糖、脂質、脂肪酸、およびそれらの塩が挙げられる。

30

## 【0253】

3-3. 機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基（B'）

B'は、(a)の生体直交性官能基が機能性物質と反応していることを除き、上述したBにおける(a)生体直交性官能基を含む2価の基と同様である。したがって、B'における3価の基および直交性官能基の定義、例および好ましい例は、(a)の生体直交性官能基が機能性物質と反応していることを除き、Bにおけるものと同様である。

40

## 【0254】

機能性物質は、その構造に応じた種々の官能基を有する。機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有する場合、機能性物質の当該官能基と生体直交性官能基とを適宜反応させることができる。生体直交性官能基と反応し易い官能基は、生体直交性官能基の具体的な種類によっても異なり得る。当業者であれば、適切な官能基を、生体直交性官能基と反応し易い官能基として適宜選択することができる（例、Boutureira et al., Chem. Rev., 2015, 115, 2174-2195）。生体直交性官能基と反応し易い官能基としては、例えば、生体直交性官能基がチオール残基の場合はマレイミド残基およびジスルフィド残基が挙げられ、生体直交性官能基がアルキン残基の場合はアジド残基が挙げられ、生体直交性官能基がアルデヒド残基またはケトン残

50

基の場合はヒドラジン残基が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、生体直交性官能基がチオール残基であり、かつ生体直交性官能基と反応し易い官能基がマレイミド残基またはジスルフィド残基である場合（またはその逆である場合）、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基は、チオスクシンイミド残基を含む3価の基、またはジスルフィド残基を含む3価の基であってもよい；生体直交性官能基がアルキン残基であり、かつ生体直交性官能基と反応し易い官能基がアジド残基である場合（またはその逆である場合）、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基は、トリアゾール残基（他の環と縮合していても縮合していなくてもよい）を含む3価の基であってもよい；生体直交性官能基がアルデヒド残基またはケトン残基であり、かつ生体直交性官能基と反応し易い官能基がヒドラジン残基である場合（またはその逆である場合）、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基は、ヒドラゾン残基を含む3価の基であってもよい（例、B o u t u r e i r a e t a l . , C h e m . R e v . , 2 0 1 5 , 1 1 5 , 2 1 7 4 - 2 1 9 5）。チオスクシンイミド残基を含む3価の基、ジスルフィド残基を含む3価の基、トリアゾール残基（他の環と縮合していても縮合していなくてもよい）を含む3価の基、またはヒドラゾン残基を含む3価の基は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基の好ましい例である。

10

【0255】

一方、機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有しない場合、機能性物質として、所望の官能基を有するように誘導体化されたものを使用することができる。例えば、機能性物質が抗体である場合、抗体が天然に有しない官能基を有するように誘導体化されたものを使用することができる。この場合、抗体の誘導体化は、本発明の方法により行われてもよい。この場合、所望の生体直交性官能基を位置選択的に有するように誘導体化された抗体を、機能性物質として使用することができる。

20

【0256】

誘導体化は、当該分野における技術常識である（例、国際公開第2004/010957号、米国特許出願公開第2006/0074008号明細書、米国特許出願公開第2005/0238649号明細書）。例えば、誘導体化は、上述したような架橋剤を用いて行われてもよい。あるいは、誘導体化は、所望の官能基を有する特定のリンカーを用いて行われてもよい。例えば、このようなリンカーは、適切な環境（例、細胞内または細胞外）において機能性物質と抗体とをリンカーの切断により分離可能なものであってもよい。このようなリンカーとしては、例えば、特定のプロテアーゼ〔例、細胞内プロテアーゼ（例、リソソーム、またはエンドソーム中に存在するプロテアーゼ）、細胞外プロテアーゼ（例、分泌性プロテアーゼ）〕で分解されるペプチジルリンカー（例、米国特許第6,214,345号；Dubowchik et al., Pharm. Therapeutics 83:67-123(1999)）、生体内に存在する局所酸性部位で切断され得るリンカー（例、米国特許第5,622,929号、同第5,122,368号；同第5,824,805号）が挙げられる。リンカーは、自壊的（self-immolative）であってもよい（例、国際公開第02/083180号、国際公開第04/043493号、国際公開第05/112919号）。本発明では、誘導体化された機能性物質も、単に「機能性物質」と呼称することができる。

30

40

【0257】

機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基において、機能性物質および生体直交性官能基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分は、当該技術分野において技術常識であり、機能性物質（機能性物質が誘導体化されている場合、その誘導体化部分）および生体直交性官能基の種類に応じて適宜決定することができる。

【0258】

機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基は、（1）上述の好ましい例において言及した残基である、チオスクシンイミド残基、トリアゾ

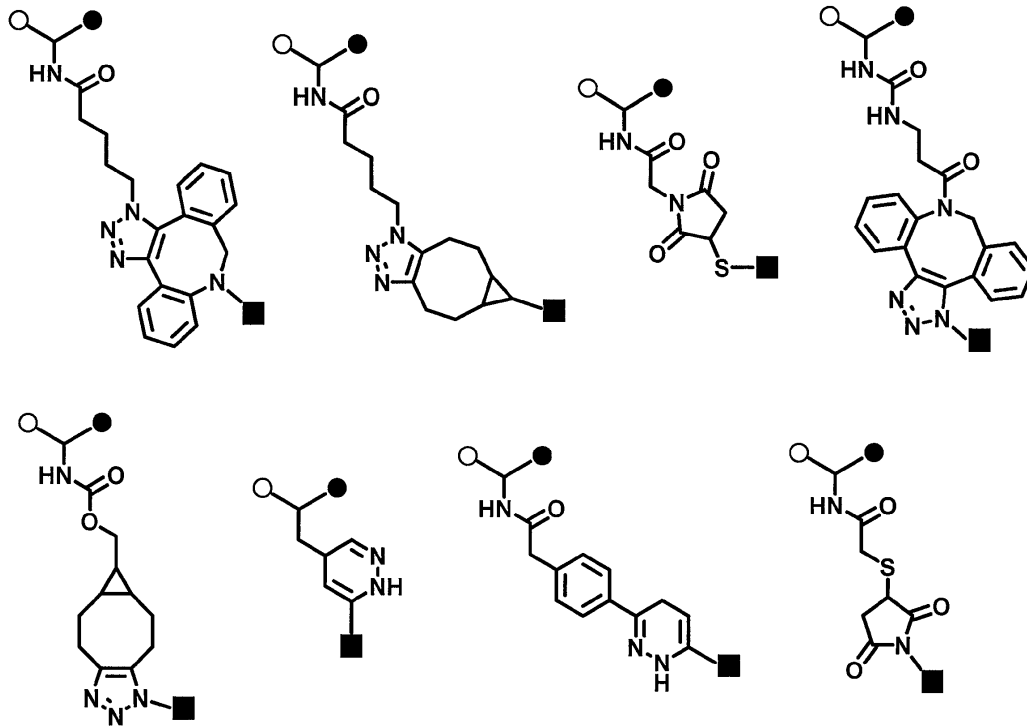
50

ール残基、またはヒドラゾン残基を含む3個の基であってもよく、あるいは、(2)特に限定されるわけではないが、例えば、ジスルフィド残基(この残基は、上述の好ましい例において言及した残基である)、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ピシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる残基を含む3個の基であってもよい。

【0259】

機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3個の基はまた、特に限定されるわけではないが、例えば、下記：

【化37】



(ここで、黒四角は機能性物質側の部分に対する結合を示し、

(白丸)はL側の部分に対する結合を示し、(黒丸)はR'側の部分に対する結合を示す。

化学構造が、切断性部分を中心にして非対称である場合、がL側の部分に対する結合を示し、がR'側の部分に対する結合を示していてもよい。)からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する残基を含む3個の基であってもよい。

【0260】

3-4. 部分構造「L-B'(-F)」

部分構造「L-B'(-F)」の詳細は、BがB'(-F)に変更されていることを除き、上記「1-6. 部分構造「L-B」」で述べたとおりである。

【0261】

一実施形態では、切断性リンカーは、(i)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2個の基である切断性リンカー、もしくは(i i)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む2個の基である切断性リンカーであってもよい。

【0262】

特定の実施形態では、切断性リンカーは、上記(i i)の切断性リンカーであってもよい。既にB'は機能性物質(F)と結合しているため、生体直交性官能基を反応性基側に生

10

20

30

40

50

成する必要がないためである。

【0263】

別の特定の実施形態では、L - B' (- F) で表される部分構造は、B2' (- F2) - L' - B1' (- F1) で表される部分構造 (すなわち、L は、B2' (- F2) - L' であり、B' は、B1' である。) であってもよい。この場合、上記式 (III) で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩は、下記式 (III') で表されることができる。



〔式中、

A、R' および T は、前記式 (III) のものと同じであり、  
L' は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、  
B1' および B2' は、同一または異なって、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 3 価の基であり、  
F1 および F2 は、同一または異なって、機能性物質であり、  
B1' (- F1) および B2' (- F2) は、L' を中心にした対称構造を有していてもよい。〕

【0264】

B1' および B2' は、同一または異なって、B' の定義、例および好ましい例と同様である。

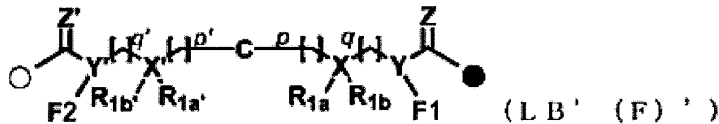
【0265】

上記式 (III') において、L' は、上述した式 (L1') ~ (L3') のいずれか一つで表されてもよい。

【0266】

別の特定の実施形態では、L - B' (- F) で表される構造単位は、下記式 (LB' (F)') で表されてもよい。

【化38】



〔式中、

C、F1、F2、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1a、R1b、R1b、Z および Z' の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

Y および Y' は、同一または異なって、前記式 (B-1) の Y から水素原子を一つ除いた残基であり、

(白丸) は、A に対する結合を示し、(黒丸) は、R' に対する結合を示す。〕

【0267】

より具体的には、Y および Y' における、前記式 (B-1) の Y から水素原子を一つ除いた残基は、-N(-)-、-CH(-)-、または上記式 (B-2) から水素原子を一つ除いた基である。構造の簡便化等の観点から、Y は、-N(-)-、または -CH(-)- であってもよい。あるいは、炭素原子を基調とした構造の設計等の観点からは、Y は、-CH(-)-、または上記式 (B-2) から水素原子を一つ除いた基であってもよい。

【0268】

上記式 (B-2) から水素原子を一つ除いた基は、下記式 (B-2') :

【化39】



〔式中、

V および V' は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH2-、または単結合で

10

20

30

40

50

あり、

V 1 は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

s は、0 ~ 10 の任意の整数であり、

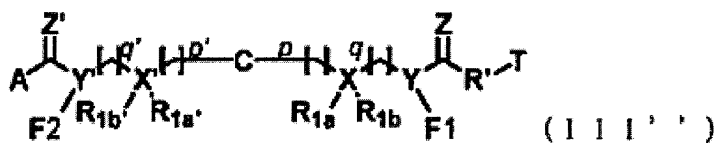
式 ( B - 2 ' ) における および は、それぞれ、式 ( B - 1 ) における および と同じ配向である。) である。] から水素原子を一つ除いた基である。式 ( B - 2 ' ) における s の定義、例および好ましい例は、式 ( B - 2 ) のものと同様である。したがって、式 ( B - 2 ' ) では、V および V ' の一方が、- N ( - ) -、または - C H ( - ) - であってもよい。あるいは、式 ( B - 2 ' ) では、V 1 は、上記 ( a ) または ( b ) の 2 価の基から水素原子が一つ除かれた 3 価の基であってもよい。あるいは、式 ( B - 2 ' ) では、s 個の - C H 2 - のうちの一つが - C H ( - ) - であってもよい。

10

【 0 2 6 9 】

この場合、上記式 ( I I I ) は、下記式 ( I I I ' ' ) として規定することができる。

【 化 4 0 】



[ 式中、

20

A、R、C、F 1、F 2、p、p '、q、q '、X、X '、R 1 a、R 1 b、R 1 a'、R 1 b'、Y、Y '、Z および Z ' の定義、例および好ましい例は、上述したものと同じである。]

【 0 2 7 0 】

上記式 ( L B ' ( F ) ' ) および ( I I I ' ' ) において、C = Z における C ( 炭素原子 ) から C = Z ' における C ( 炭素原子 ) までの長さは、上述したような A および R を連結する主鎖の長さと同様である。これらの式において、C = Z における C から C = Z ' における C までの長さはまた、C = Z における C から C = Z ' における C を連結する部分構造の連結鎖 ( 水素原子および置換基を除く ) を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、A および R を連結する主鎖を構成する原子数と同様である。C = Z における C から C = Z ' における C を連結する部分構造の連結鎖 ( 水素原子および置換基を除く ) は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖 ( 水素原子および置換基を除く ) は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

30

【 0 2 7 1 】

3 - 5 . 抗体が有する、抗体以外の部分構造の結合部位 ( 位置選択性 )

抗体以外の部分構造 ( 例、A - L - B ' ( - F ) - R ' ) は、抗体 ( T ) における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。具体的には、T が、連続する 1 ~ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む場合、抗体以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30 % 以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

40

【 0 2 7 2 】

3 - 6 . 抗体が有する、抗体以外の部分構造の個数

抗体 ( T ) が保有する、抗体以外の部分構造 ( 例、A - L - B ' ( - F ) - R ' ) の個数は、変動することができる。例えば、T が複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、T は、複数個の単量体タンパク質中の対応する複数個の標的領域において、T 以外の部分構造を有することができる。その結果、T は、T 以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式 ( I I I )、( I I I ' )、または ( I I I ' ' ) で表される構造は、T が、T 以外の部分構造を 1 個または複数個有していてもよいことを示す

50

。Tが有する、T以外の部分構造の個数は、抗体の種類、および抗体とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、抗体の種類によっても異なるが、例えば1～8、好ましくは1～4、より好ましくは1または2であってもよい。

【0273】

特定の実施形態では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、抗体が、複数個の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数個の単量体タンパク質の同一標的領域に対して抗体以外の部分構造を複数個導入することができる。

【0274】

好ましい実施形態では、抗体は、複数個の重鎖を含む抗体であってもよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、IgG、IgE、およびIgDについては1個または2個（好ましくは2個）であり、IgAについては1～4個（好ましくは4個）であり、IgMについては1～8個（好ましくは8個）であってもよい。

【0275】

3-7. 製造方法

本発明は、以下を含む、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の製造方法を提供する：

(B1) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成すること。

【0276】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体は、式(II)、好ましくは式(II')、より好ましくは式(II'')で表される。抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体は、式(III)、好ましくは式(III')、より好ましくは式(III'')で表される。

【0277】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩は、機能性物質に対して反応することができる生体直交性官能基を有するため、機能性物質と反応することができる。このような反応は、上記「2-6. 製造方法」で述べたような、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。

【0278】

反応系において、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩(X)に対する機能性物質(Y)のモル比率(Y/X)は、抗体および機能性物質の種類、機能性物質によって修飾されるべき抗体中の部位の数（例、DAR）等に応じて変動することから特に限定されないが、例えば0.1～100であり、好ましくは0.5～80であり、より好ましくは1～70であり、さらにより好ましくは2～50であり、特に好ましくは3～30である。

【0279】

抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認、抗体以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2-6. 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

【0280】

本発明はまた、以下を含む、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および

10

20

30

40

50

抗体を有する複合体またはその塩の製造方法を提供する：

( B 2 ) 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を抗体と反応させて、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を生成すること；および

( B 3 ) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成すること。

【 0 2 8 1 】

上記 ( B 2 ) の工程は、上記「 2 - 6 . 製造方法」で述べた上記 ( A 1 ) の工程と同様にして行うことができる。上記 ( B 3 ) の工程は、上記 ( B 1 ) の工程と同様にして行うことができる。上記 ( B 2 ) および ( B 3 ) の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記 ( B 2 ) および ( B 3 ) の工程は、抗体中の反応標的である特定のアミノ酸残基と反応性基との反応対、および機能性物質中の官能基と生体直交性官能基との反応対の組合せに応じて、同時に行うことができる。すなわち、上記 ( B 2 ) および ( B 3 ) の工程が同時に行われる場合、上記 ( B 2 ) の工程で得られる生成物を単離することなく、上記 ( B 2 ) の工程で得られる生成物含有反応液が、上記 ( B 3 ) の工程に付されてもよい。

10

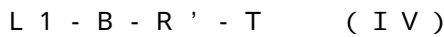
【 0 2 8 2 】

4 . 生体直交性官能基を有する抗体またはその塩

4 - 1 . 製造方法の概要

本発明は、式 ( I V ) で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する。

20



[ 式中、

L 1 は、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B は、( a ) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または ( b ) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R ' は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、抗体である。]

【 0 2 8 3 】

4 - 2 . ( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基 ( L 1 )

30

式 ( I V ) において、L 1 は、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または ( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。このような 1 価の基は、上述したような切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーの切断により生成し得る 1 価の基である。したがって、L 1 は、上述したような切断性部分の残基または化学構造の切断により生成し得る 1 価の基であってもよい。より具体的には、( i ' ) 生体直交性官能基を含む 1 価の基は、上述した ( i ) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーの切断により生成し得る 1 価の基であってもよく、( i i ' ) 生体直交性官能基を含まない 1 価の基は、( i i ) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーの切断により生成し得る 1 価の基であってもよい。

40

【 0 2 8 4 】

特定の実施形態では、L 1 は、下記式 ( L 1 - 1 ) または ( L 1 - 2 ) のいずれか一つで表されてもよい：



[ 式中、

L b は、2 価の基であり、

C 1 は、生体直交性官能基、または生体直交性官能基以外の基である。]

50

## 【0285】

2価の基としては、例えば、置換基を有していてもよい2価の炭化水素基、置換基を有していてもよい2価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_a-$  ( $R_a$ は水素原子、または置換基を示す)、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=S)-$ 、およびこれらの2以上(例えば2~8、好ましくは2~6、より好ましくは2~4)の組み合わせからなる基が挙げられる。2価の炭化水素基、2価の複素環基、および置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

## 【0286】

生体直交性官能基の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

## 【0287】

生体直交性官能基以外の基としては、例えば、上述した置換基のうち、生体直交性官能基以外のものが挙げられる。生体直交性官能基以外のこのような基としては、例えば、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、1価の複素環基、ヒドロキシル、アミノ、アルキルオキシ(アルコキシ)、シクロアルキルオキシ、アラルキルオキシ)が挙げられる。これらの基およびこれらの基の構成要素(例、アルキルオキシ(アルコキシ)におけるアルキル、シクロアルキルオキシにおけるシクロアルキル、およびアラルキルオキシにおけるアラルキル)の定義、例および好ましい例については、上述したものと同様である。

## 【0288】

特定の実施形態では、 $L_b$ は、下記( $L_b'$ ):

## 【化41】



[式中、

$p$ は、0~10の任意の整数であり、

$q$ は、0~10の任意の整数であり、

$X$ は、炭素原子、窒素原子、または単結合(ここで、 $X$ が窒素原子である場合、 $R_{1b}$ は存在しない。 $X$ が単結合である場合、 $R_{1a}$ および $R_{1b}$ は存在しない)であり、

$R_{1a}$ 、および $R_{1b}$ は、同一または異なって、水素原子、または上述する置換基からなる群より選ばれる。

(白丸)は、 $C_1$ に対する結合を示し、(黒丸)は $B$ に対する結合を示す。)で表されてもよい。

## 【0289】

$p$ 、 $q$ 、および $X$ 、ならびに $R_{1a}$ 、および $R_{1b}$ (置換基)の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

## 【0290】

4-3. 部分構造「 $L_1-B$ 」

4-3-1.  $L_1$ 末端部分および $R'$ を連結する部分構造「 $L_1-B$ 」の長さ

式(IV)において、切断により生成した $L_1$ 末端部分(または $C_1$ 末端部分)および $R'$ を連結する部分構造(「 $L_1-B$ 」中の直鎖部分)の長さ(あるいは、式(IV)等の特定の式に限定されない、生体直交性官能基を位置選択的に有する抗体またはその塩における、生体直交性官能基および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数。以下同様)は、上記「1-6-1. AおよびRを連結する部分構造「 $L-B$ 」中の主鎖の長さ」で述べたような種々の因子に応じて、適宜設計することができる。

## 【0291】

切断により生成した $L_1$ 末端部分(または $C_1$ 末端部分)および $R'$ を連結する部分構造の長さは、例えば約2.5以上、好ましくは約4以上、より好ましくは約5以上であってよい。部分構造の長さはまた、例えば約15以下、好ましくは約12以下、より好ましくは約8以下であってよい。より具体的には、部分構造の長さは、例えば

10

20

30

40

50



約 2.5 ~ 15、好ましくは約 4 ~ 12、より好ましくは約 5 ~ 8 であってもよい。

【0292】

より具体的には、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の長さは、部分構造の連結鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。連結鎖を構成する原子数は、例えば 2 個（約 2.5）以上、好ましくは 3 個（約 4）以上、より好ましくは 4 個（約 5）以上であってもよい。連結鎖を構成する原子数はまた、例えば 10 個（約 15）以下、好ましくは 8 個（約 12）以下、より好ましくは 6 個（約 8）以下であってもよい。より具体的には、連結鎖を構成する原子数は、例えば 2 ~ 10 個、好ましくは 3 ~ 8 個、より好ましくは 4 ~ 6 個であってもよい。

10

【0293】

切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の連結鎖が 2 価の環構造を含まない鎖状構造である場合、連結鎖の原子数は、連結鎖中の原子数を数えることにより決定することができる。

【0294】

一方、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の連結鎖が 2 価の環構造を含む構造である場合、連結鎖の原子数と上述した長さとは必ずしも対応せず、連結鎖の原子数により規定され得る長さは、上述した長さよりも短くなる傾向がある。このような場合であっても、原子数により連結鎖の長さを規定する観点から、連結鎖の原子数を便宜的に数えることができる。具体的には、このような場合における連結鎖の原子数は、上述したように、連結鎖において 2 価の環構造を含まない鎖状構造中の原子数に加えて、2 価の環構造中の 2 つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定してもよい。

20

【0295】

好ましくは、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の連結鎖は、2 価の環構造を含まない鎖状構造であってもよい。この場合、切断により生成した末端部分および R' を連結する部分構造の連結鎖において 2 価の環基が含まれないように L1 - B を適宜設計することができる。

【0296】

特定の実施形態では、L1 - B で表される部分構造は、好ましくは、ペプチド部分を含まない。この場合、本発明の生体直交性官能基を有する抗体を用いて得られる本発明の機能性物質を有する抗体（例、抗体薬物複合体）は、免疫原性を有し得るペプチド部分をリンカーとして含み得ないという利点がある。

30

【0297】

4 - 3 - 2 . 部分構造「L1 - B」の具体的構造

上記式 (IV) において、L1 および B は、互いに関連し得る構造である。したがって、上記式 (IV) において、L1 および B は、「L1 - B」で表される部分構造として規定することができる。

【0298】

特定の実施形態では、L1 が (i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基である場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基である。

40

【0299】

好ましくは、L1 が (i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基である場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。この場合、(i') における生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、(i') における生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、2 種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保等、および反応における一部の生体直交性官能基の不使用の観点では、(i') における生体直交性官能基は、(a)

50

)における生体直交性官能基と異種であってもよい。

【0300】

あるいは、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であってもよい。この場合、式(IV)で表される、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩は、より単純な構造を有することになるので、合成が容易である。

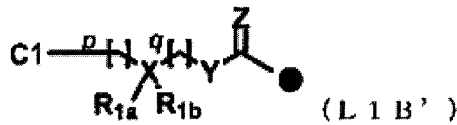
【0301】

別の特定の実施形態では、L1が(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基である。

【0302】

特定の実施形態では、L1-Bで表される構造単位は、下記式(L1B')で表されてもよい。

【化42】



[式中、

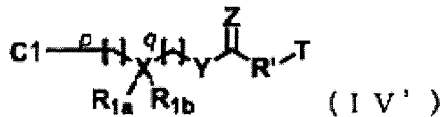
C1、p、q、X、R1a、R1b、Y、およびZの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

(黒丸)は、R'に対する結合を示す。]

【0303】

したがって、上記式(IV)は、下記式(IV')として規定することができる。

【化43】



[式中、

C1、p、q、X、R1a、R1b、Y、Z、R'、およびTの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。]

【0304】

上記式(L1B')および(IV')において、C=ZにおけるCからC1までの長さは、切断により生成したL1末端部分(またはC1末端部分)およびR'を連結する部分構造の長さと同様である。これらの式において、C=ZにおけるCからC1までの長さはまた、C=ZにおけるCからC1までの部分構造の連結鎖(水素原子および置換基を除く)を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、切断により生成したL1末端部分(またはC1末端)およびR'を連結する部分構造(水素原子および置換基を除く)を構成する原子数と同様である。C=ZにおけるCからC1を連結する部分構造の連結鎖(水素原子および置換基を除く)は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖(水素原子および置換基を除く)は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

【0305】

4-4. 抗体が有する、抗体以外の部分構造の結合部位(位置選択性)

抗体以外の部分構造(例、L1-B-R')は、抗体(T)における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。具体的には、Tが、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む場合、抗体以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、

10

20

30

40

50

例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0306】

4 - 5 . 抗体が有する、抗体以外の部分構造の個数

抗体 ( T ) が保有する、抗体以外の部分構造 ( 例、 L 1 - B - R ' ) の個数は、変動することができる。例えば、 T が複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、 T は、複数個の単量体タンパク質中の対応する複数個の標的領域において、 T 以外の部分構造を有することができる。その結果、 T は、 T 以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式 ( I V I )、( I V ' )、または I V ' ' ) で表される構造は、 T が、 T 以外の部分構造を 1 個または複数個有していてもよいことを示す。 T が有する、 T 以外の部分構造の個数は、抗体の種類、および抗体とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、抗体の種類によっても異なるが、例えば 1 ~ 8、好ましくは 1 ~ 4、より好ましくは 1 または 2 であってもよい。

10

【0307】

特定の実施形態では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、抗体が、複数個の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数個の単量体タンパク質の同一標的領域に対して抗体以外の部分構造を複数個導入することができる。

【0308】

好ましい実施形態では、抗体は、複数個の重鎖を含む抗体であってもよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、 I g G、I g E、および I g D については 1 個または 2 個 ( 好ましくは 2 個 ) であり、 I g A については 1 ~ 4 個 ( 好ましくは 4 個 ) であり、 I g M については 1 ~ 8 個 ( 好ましくは 8 個 ) であってもよい。

20

【0309】

4 - 6 . 製造方法

本発明は、以下を含む、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する：

( C 1 ) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること。

30

【0310】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体は、式 ( I I )、好ましくは式 ( I I ' )、より好ましくは式 ( I I ' ' ) で表される。生体直交性官能基を有する抗体は、式 ( I V )、好ましくは式 ( I V ' )、より好ましくは式 ( I V ' ' ) で表される。

【0311】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩は、上述したような切断処理により切断することができる切断性部分を有するため、切断することができる。このような切断反応は、上記「2 - 6 . 製造方法」で述べたような、タンパク質の変性・分解 ( 例、アミド結合の切断 ) を引き起こし得ない条件 ( 温和な条件 ) 下で適宜行うことができる。

40

【0312】

切断処理としては、例えば、( a ) 酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる 1 種以上の物質による処理、( b ) 光からなる群より選ばれる物理化学的的刺激による処理、または ( c ) 自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置が挙げられる。このような切断処理の条件は、当該分野における技術常識である ( 例、G . L e r i c h e , L . C h i s h o l m , A . W a g n e r , B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y . 2 0 , 5 7 1 ( 2 0 1 2 ) ; F e n g P . e t a l . , J o u r n a l o f A m e r i c a n C h e m i c a l S o c i e t y . 1 3 2 , 1 5 0 0 ( 2 0 1 0 ) . ; B e s s o d e s M . e t a l . , J o u r n a l o f C o n t r o l l e d R e l e a s e , 9 9 , 4 2 3

50

(2004). ; De Simone, J. M., Journal of American Chemical Society. 132, 17928 (2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187 (2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291 (2004)。

【0313】

生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性  
10

【0314】

本発明はまた、以下を含む、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する：

(C2) 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を抗体と反応させて、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を生成すること；および

(C3) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること。  
20

【0315】

上記(C2)の工程は、上記「2-6. 製造方法」で述べた上記(A1)の工程と同様にして行うことができる。上記(C3)の工程は、上記(C1)の工程と同様にして行うことができる。上記(C2)および(C3)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(C2)および(C3)の工程は、反応性基と、切断により生成され得る生体直交性官能基との組合せ(非反応性)等の因子に応じて、同時に行うことができる。すなわち、上記(C2)および(C3)の工程が同時に行われる場合、上記(C2)の工程で得られる生成物を単離することなく、上記(C2)の工程で得られる生成物含有反応液が、上記(C3)の工程に付されてもよい〔例、上記(C2)の工程で得られる生成物含有反応液に対して、生成物に存在する切断性リンカー中の切断性部分を切断するために塩基性物質(求核剤であるヒドロキシルアミン)が添加されている実施例(81-9)および(84-8)を参照〕。  
30

【0316】

5. 機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法

5-1. 概要

本発明は、式(V)で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する。



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、  
40

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

(L1 - B)'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む2価の構造単位であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。〕

【0317】

10

20

30

40

50

## 5 - 2 . 部分構造「F - ( L 1 - B ) ' 」

## 5 - 2 - 1 . FおよびR ' を連結する部分構造「L 1 - B」の長さ

式(V)において、FおよびR ' を連結する部分構造「L 1 - B」(「L 1 - B」中の直鎖部分)の長さ(あるいは、式(V)等の特定の式に限定されない、機能性物質を位置選択的に有する抗体またはその塩における、機能性物質および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数、または機能性物質が生体直交性官能基を介して抗体に結合している場合には、生体直交性官能基および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数。以下同様)は、上記「1 - 6 - 1 . AおよびRを連結する部分構造「L - B」中の主鎖の長さ」で述べたような種々の因子に応じて、適宜設計することができる。

## 【0318】

FおよびR ' を連結する部分構造の長さは、例えば約2 . 5 以上、好ましくは約4 以上、より好ましくは約5 以上であってもよい。部分構造の長さはまた、例えば約15 以下、好ましくは約12 以下、より好ましくは約8 以下であってもよい。より具体的には、部分構造の長さは、例えば約2 . 5 ~ 15 、好ましくは約4 ~ 12 、より好ましくは約5 ~ 8 であってもよい。

## 【0319】

より具体的には、FおよびR ' を連結する部分構造の長さは、部分構造の連結鎖(水素原子および置換基を除く)を構成する原子数として規定することもできる。連結鎖を構成する原子数は、例えば2個(約2 . 5 )以上、好ましくは3個(約4 )以上、より好ましくは4個(約5 )以上であってもよい。連結鎖を構成する原子数はまた、例えば10個(約15 )以下、好ましくは8個(約12 )以下、より好ましくは6個(約8 )以下であってもよい。より具体的には、連結鎖を構成する原子数は、例えば2 ~ 10個、好ましくは3 ~ 8個、より好ましくは4 ~ 6個であってもよい。

## 【0320】

FおよびR ' を連結する部分構造の連結鎖が2価の環構造を含まない鎖状構造である場合、連結鎖の原子数は、連結鎖中の原子数を数えることにより決定することができる。

## 【0321】

一方、FおよびR ' を連結する部分構造の連結鎖が2価の環構造を含む構造である場合、連結鎖の原子数と上述した長さとは必ずしも対応せず、連結鎖の原子数により規定され得る長さは、上述した長さよりも短くなる傾向がある。このような場合であっても、原子数により連結鎖の長さを規定する観点から、連結鎖の原子数を便宜的に数えることができる。具体的には、このような場合における連結鎖の原子数は、上述したように、連結鎖において2価の環構造を含まない鎖状構造中の原子数に加えて、2価の環構造中の2つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定してもよい。

## 【0322】

好ましくは、FおよびR ' を連結する部分構造の連結鎖は、2価の環構造を含まない鎖状構造であってもよい。FおよびR ' を連結する部分構造の連結鎖において2価の環基が含まれないようにL 1 - Bを適宜設計することができる。

## 【0323】

特定の実施形態では、L 1 - Bで表される部分構造は、好ましくは、ペプチド部分を含まない。この場合、本発明の機能性物質を有する抗体(例、抗体薬物複合体)は、免疫原性を有し得るペプチド部分をリンカーとして含まないという利点がある。

## 【0324】

## 5 - 2 - 2 . 部分構造「F - ( L 1 - B ) ' 」の具体的構造

式(V)において、F - ( L 1 - B ) ' におけるL 1およびBは、互いに関連し得る構造である。したがって、上記式(V)において、L 1およびBは、「L 1 - B」で表される部分構造として規定することができる。

## 【0325】

また、F - ( L 1 - B ) ' で表される構造単位は、機能性物質と、( i ' )および( a )における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分で

10

20

30

40

50

ある。反応に供された生体直交性官能基は、式(V)において、存在しない。したがって、式(V)において、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方は、存在しない。機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分と同じである。したがって、本明細書において、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分の例(残基の名称)および具体例(化学構造式)は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分について上述したものと同一である。

## 【0326】

10

一実施形態では、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基である。

## 【0327】

好ましい実施形態では、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基である。この場合、(i')における生体直交性官能基は、(a)における生体直交性官能基と同種であっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、(i')における生体直交性官能基は、(a)における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、2種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保、および反応における一部の生体直交性官能基の不利用等の観点では、(i')における生体直交性官能基は、(a)における生体直交性官能基と異種であってもよい。

20

## 【0328】

別の好ましい実施形態では、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であってもよい。この場合、式(V)で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩は、より単純な構造を有することになるので、合成が容易である。

## 【0329】

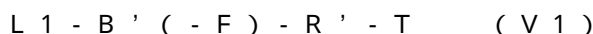
別の実施形態では、L1が(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基である。

30

## 【0330】

特定の実施形態では、(i')および(a)における生体直交性官能基が異種である場合、式(V)で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩は、式(V1)または(V2)で表されてもよい。

## 【0331】



[式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

40

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。]

## 【0332】



[式中、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含ま

50

ない2価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。]

【0333】

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基である。機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分と同じである。したがって、本明細書において、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分の例(残基の名称)および具体例(化学構造式)は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分について上述したものと同一である。したがって、機能性物質が生体直交性官能基と反応するので、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基(L1')は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基と表現することもできる(以下同様)。より具体的には、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基は、(1)上述の好ましい例において言及した残基である、チオスクシンイミド残基、トリアゾール残基、またはヒドラゾン残基を含む2価の基であってもよく、あるいは、(2)特に限定されるわけではないが、例えば、ジスルフィド残基(この残基は、上述の好ましい例において言及した残基である)、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる残基を含む2価の基であってもよいが、(1)チオスクシンイミド残基、トリアゾール残基、またはヒドラゾン残基を含む2価の基が好ましい。

10

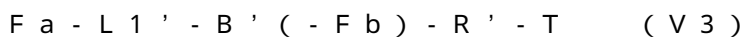
20

【0334】

別の特定の実施形態では、(i')および(a)における生体直交性官能基が同種または異種である場合、式(V)で表される、機能性物質を有する抗体またはその塩は、式(V3)で表されてもよい。

30

【0335】



[式中、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む3価の基であり、

FaおよびFbは、それぞれ、同一または異なる機能性物質であり、

R'は、抗体と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

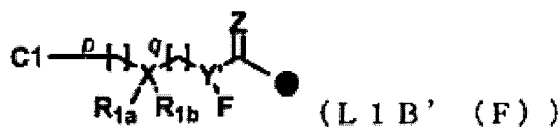
Tは、抗体である。]

40

【0336】

特定の実施形態では、上記式(V1)において、L1-B'(-F)で表される構造単位は、下記式(L1B'(F))で表されてもよい。

【化44】



[式中、

F、C1、p、q、X、R1a、R1b、およびZの定義、例および好ましい例は、上述

50

したものと同一であり、

Y' は、前記式 ( B - 1 ) の Y から水素原子を一つ除いた残基であり、

( 黒丸 ) は、R' に対する結合を示す。]

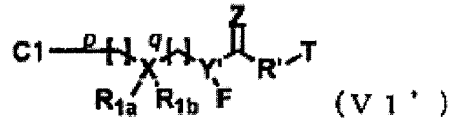
【 0 3 3 7 】

前記式 ( B - 1 ) の Y から水素原子を一つ除いた残基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様である。

【 0 3 3 8 】

したがって、上記式 ( V 1 ) は、下記式 ( V 1' ) として規定することができる。

【 化 4 5 】



10

[ 式中、

F、Cl、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Z、R'、および T の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

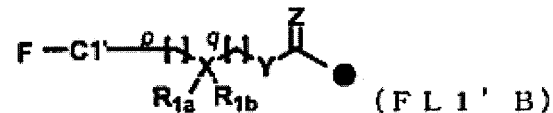
Y' は、前記式 ( B - 1 ) の Y から水素原子を一つ除いた残基である。]

【 0 3 3 9 】

特定の実施形態では、上記式 ( V 2 ) において、F - L 1' - B で表される構造単位は、下記式 ( F L 1' B ) で表されてもよい。

20

【 化 4 6 】



[ 式中、

F、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Y、および Z の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

Cl' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

( 黒丸 ) は、R' に対する結合を示す。]

30

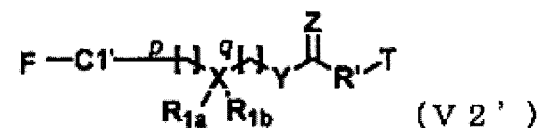
【 0 3 4 0 】

Cl' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。Cl' における、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分の定義、例および好ましい例は、上記「機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基」で述べたものと同様である ( 以下同様 ) 。

【 0 3 4 1 】

したがって、上記式 ( V 2 ) は、下記式 ( V 2' ) として規定することができる。

【 化 4 7 】



40

[ 式中、

F、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Y、Z、R'、および T の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

Cl' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。]

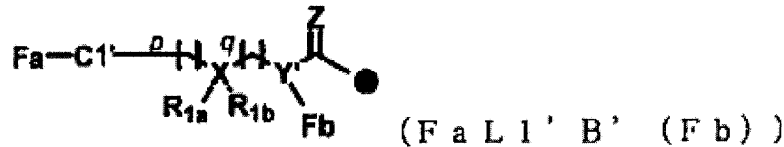
【 0 3 4 2 】

特定の実施形態では、上記式 ( V 3 ) において、F a - L 1' - B' ( - F b ) で表される構造単位は、下記式 ( F a L 1' B' ( F b ) ) で表されてもよい。

50



【化48】



〔式中、

F a、F b、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、およびZの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

C 1' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

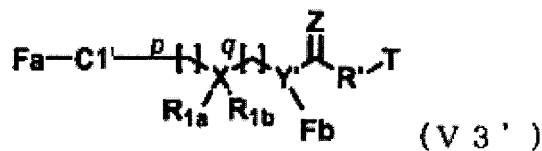
Y' は、前記式 (B - 1) のYから水素原子を一つ除いた残基であり、

(黒丸)は、R'に対する結合を示す。]

【0343】

したがって、上記式 (V 3) は、下記式 (V 3') として規定することができる。

【化49】



〔式中、

F a、F b、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Z、R'、およびTの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

C 1' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

Y' は、前記式 (B - 1) のYから水素原子を一つ除いた残基である。]

【0344】

上記式 (L 1 B' (F))、(F L 1' B)、および (F a L 1' B' (F 2))、ならびに (V 1')、(V 2') および (V 3') において、C = Z におけるCからC 1までの長さは、切断により生成したL 1末端部分 (またはC 1末端部分) およびR' を連結する部分構造の長さと同様である。これらの式において、C = Z におけるCからC 1までの長さはまた、C = Z におけるCからC 1までの部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、切断により生成したL 1末端部分 (またはC 1末端) およびR' を連結する部分構造 (水素原子および置換基を除く) を構成する原子数と同様である。C = Z におけるCからC 1を連結する部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

【0345】

5 - 3 . 抗体が有する、抗体以外の部分構造の結合部位 (位置選択性)

抗体以外の部分構造 (例、F - (L 1 - B)' - R') は、抗体 (T) における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。具体的には、Tが、連続する1 ~ 50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む場合、抗体以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0346】

5 - 4 . 抗体が有する、抗体以外の部分構造の個数

抗体 (T) が保有する、抗体以外の部分構造 (例、F - (L 1 - B)' - R') の個数は、変動することができる。例えば、Tが複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質

10

20

30

40

50

である場合、Tは、複数個の単量体タンパク質中の対応する複数個の標的領域において、T以外の部分構造を有することができる。その結果、Tは、T以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式(V)、(V1)、(V2)、(V3)、(V1')、(V2')、または(V3')で表される構造は、Tが、T以外の部分構造を1個または複数個有していてもよいことを示す。Tが有する、T以外の部分構造の個数は、抗体の種類、および抗体とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、抗体の種類によっても異なるが、例えば1~8、好ましくは1~4、より好ましくは1または2であってもよい。

#### 【0347】

特定の実施形態では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、抗体が、複数個の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数個の単量体タンパク質の同一標的領域に対して抗体以外の部分構造を複数個導入することができる。

10

#### 【0348】

好ましい実施形態では、抗体は、複数個の重鎖を含む抗体であってもよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、IgG、IgE、およびIgDについては1個または2個(好ましくは2個)であり、IgAについては1~4個(好ましくは4個)であり、IgMについては1~8個(好ましくは8個)であってもよい。

#### 【0349】

### 5-5. 製造方法

本発明は、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する。本製造方法は、(D)抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を原料として使用する方法(図2の反応(3)を参照)、および(E)生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を原料として使用する方法(図2の反応(5)を参照)に分類することができる。

20

#### 【0350】

(D)抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を原料として使用する方法は、以下を含む：

(D1)抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成すること。

30

#### 【0351】

抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体は、式(III)、好ましくは式(III')、より好ましくは式(III'')で表される。機能性物質を有する抗体は、式(V)、好ましくは式(V1)、(V2)、または(V3)、より好ましくは式(V1')、(V2')、または(V3')で表される。

#### 【0352】

抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩は、上述したような切断処理により切断することができる切断性部分を有するため、切断することができる。このような切断反応は、上記「4-6. 製造方法」で述べたような様式において行うことができる。

40

#### 【0353】

機能性物質を有する抗体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー(例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC)、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認、抗体以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2-6. 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

#### 【0354】

50

本発明はまた、以下を含む、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する：

(D2) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成すること；および

(D3) 抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成すること。

【0355】

上記(D2)の工程は、上記「3-7. 製造方法」で述べた上記(B1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D3)の工程は、上記(D1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D2)および(D3)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(D2)および(D3)の工程は、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。すなわち、上記(D2)および(D3)の工程が同時に行われる場合、上記(D2)の工程で得られる生成物を単離することなく、上記(D2)の工程で得られる生成物含有反応液が、上記(D3)の工程に付されてもよい。

10

【0356】

本発明はさらに、以下を含む、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する：

20

(D4) 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を抗体と反応させて、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を生成すること；

(D5) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩を生成すること；および

(D6) 抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成すること。

【0357】

30

上記(D4)の工程は、上記「2-6. 製造方法」で述べた上記(A1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D5)および(D6)の工程は、上記(D2)および(D3)の工程と同様にして行うことができる。上記(D5)の工程は、上記「3-7. 製造方法」で述べた上記(B1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D6)の工程は、上記(D1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D4)~(D6)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(D4)~(D6)の工程の少なくとも一部は、反応性基、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。すなわち、上記(D4)~(D6)の工程のうち2以上の工程が同時に行われる場合、先の工程で得られる生成物を単離することなく、先の工程で得られる生成物含有反応液が、次の工程に付されてもよい。

40

【0358】

(E) 生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を原料として使用する方法は、以下を含む：

(E1) 生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成すること。

【0359】

生体直交性官能基を有する抗体は、式(IV)、好ましくは式(IV')で表される。機能性物質を有する抗体は、式(V)、好ましくは式(V1)、(V2)、または(V3)、より好ましくは式(V1')、(V2')、または(V3')で表される。

【0360】

50

生体直交性官能基を有する抗体はまたはその塩は、生体直交性官能基を有するため、機能性物質と反応することができる。このような反応は、上記「3 - 7 . 製造方法」で述べたような様式において行うことができる。

【0361】

機能性物質を有する抗体またはその塩の生成の確認は、上述したような方法により行うことができる。位置選択性の確認、抗体以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2 - 6 . 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

【0362】

本発明はまた、以下を含む、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する：

(E2) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること；および

(E3) 生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成すること。

【0363】

上記(E2)の工程は、上記「4 - 6 . 製造方法」で述べた上記(C1)の工程と同様にして行うことができる。上記(E3)の工程は、上記(E1)の工程と同様にして行うことができる。上記(E2)および(E3)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(E2)および(E3)の工程は、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。すなわち、上記(E2)および(E3)の工程が同時に行われる場合、上記(E2)の工程で得られる生成物を単離することなく、上記(E2)の工程で得られる生成物含有反応液が、上記(E3)の工程に付されてもよい。

【0364】

本発明はさらに、以下を含む、機能性物質を有する抗体またはその塩の製造方法を提供する：

(E4) 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を抗体と反応させて、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩を生成すること；

(E5) 抗体に対する親和性物質、および切断性部分を含む抗体またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を生成すること；および

(E6) 生体直交性官能基を有する抗体またはその塩を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する抗体またはその塩を生成すること。

【0365】

上記(E4)の工程は、上記「2 - 6 . 製造方法」で述べた上記(A1)の工程と同様にして行うことができる。上記(E5)および(E6)の工程は、上記(E2)および(E3)の工程と同様にして行うことができる。上記(E4)～(E6)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(E4)～(E6)の工程の少なくとも一部は、反応性基、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。すなわち、上記(E4)～(E6)の工程のうち2以上の工程が同時に行われる場合、先の工程で得られる生成物を単離することなく、先の工程で得られる生成物含有反応液が、次の工程に付されてもよい。

【0366】

6 . 塩

本発明において、塩としては、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、およびアミノ酸との塩が挙げられる。無機酸との塩としては、例えば、塩化水素、臭化水素、リン酸、硫酸、硝酸との塩が挙げられる。有機酸との塩としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、乳酸、酒石酸、フマル酸、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエン sulfonic 酸との塩が挙げられる。無機塩基との塩としては、例えば、アルカリ金属(例、ナトリウム、

10

20

30

40

50

カリウム)、アルカリ土類金属(例、カルシウム、マグネシウム)、および亜鉛、アルミニウム等の他の金属、ならびにアンモニウムとの塩が挙げられる。有機塩基との塩としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、プロピレンジアミン、エチレンジアミン、ピリジン、エタノールアミン、モノアルキルエタノールアミン、ジアルキルエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンとの塩が挙げられる。アミノ酸との塩としては、例えば、塩基性アミノ酸(例、アルギニン、ヒスチジン、リジン、オルニチン)、および酸性アミノ酸(例、アスパラギン酸、グルタミン酸)との塩が挙げられる。塩は、好ましくは、無機酸(例、塩化水素)との塩、または有機酸(例、トリフルオロ酢酸)との塩である。

【0367】

#### 7. 用途

抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する本発明の化合物またはその塩は、例えば、抗体の位置選択的な修飾に有用である。したがって、本発明は、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含む、抗体の位置選択的修飾試薬を提供する。

【0368】

本発明の位置選択的修飾試薬は、他の成分をさらに含む組成物の形態で提供されてもよい。このような他の成分としては、例えば、溶液、安定化剤(例、酸化防止剤、保存剤)が挙げられる。溶液としては、水溶液が好ましい。水溶液としては、例えば、水(例、蒸留水、滅菌蒸留水、精製水、生理食塩水)、緩衝液(例、リン酸水溶液、Tris-塩酸緩衝液、炭酸-重炭酸緩衝液、ホウ酸水溶液、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液、クエン酸緩衝液)が挙げられるが、緩衝液が好ましい。溶液のpHは、例えば5.0~9.0、好ましくは5.5~8.5である。本発明の位置選択的修飾試薬は、液状または粉末状(例、凍結乾燥粉末)において提供することができる。

【0369】

抗体に対する親和性物質、および切断性部分を(位置選択的に)有する本発明の抗体またはその塩、抗体に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および抗体を(位置選択的に)有する本発明の複合体またはその塩、ならびに生体直交性官能基を(位置選択的に)有する本発明の抗体またはその塩は、例えば、機能性物質を(位置選択的に)有する抗体またはその塩の調製のための中間体として有用である。

【0370】

機能性物質を(位置選択的に)有する本発明の抗体またはその塩は、例えば、医薬、または試薬(例、診断薬、研究用試薬)として有用である。

【0371】

特に、機能性物質を(位置選択的に)有する本発明の抗体またはその塩は、医薬として有用である。抗体薬物複合体(ADC)の薬物の結合数および結合位置を変化させると、体内動態や薬物の放出速度、効果が変化することが上記のとおり報告されている。これらのことから次世代型ADCではコンジュゲーションする薬物の個数と位置を制御することが求められている。個数および位置が一定であると、期待通りのefficacy、コンジュゲーション薬剤のバリエーション、ロット差いわゆるレギュレーションの問題が解決すると考えられている。機能性物質を有する本発明の抗体またはその塩は、このようなレギュレーションの問題を解決することができる。したがって、機能性物質を有する本発明の抗体またはその塩は、医薬組成物の形態において提供されてもよい。このような医薬組成物は、機能性物質を有する抗体またはその塩に加えて、医薬上許容され得る担体を含んでいてもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリ

10

20

30

40

50

ン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。機能性物質を有する本発明の抗体またはその塩はまた、安定性を実現する任意の修飾（例、PEG化）を有していてもよい。

【0372】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

【0373】

医薬組成物は、非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与）に好適である。このような非経口的な投与に好適な医薬組成物としては、水性および非水性の等張無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。

【0374】

医薬組成物の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、適宜設定することができる。

【実施例】

【0375】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0376】

[実施例1：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(1-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q I I W C T Y H - NH<sub>2</sub>（配列番号5）のペプチドをFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用した。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用した。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin, HL、アルギニン（R）、システイン（C）、ヒスチジン（H）はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール = 94 : 2.5 : 1.0 : 2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈殿を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.1%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行った。目的物（215 mg, 103 μmol）を得た。

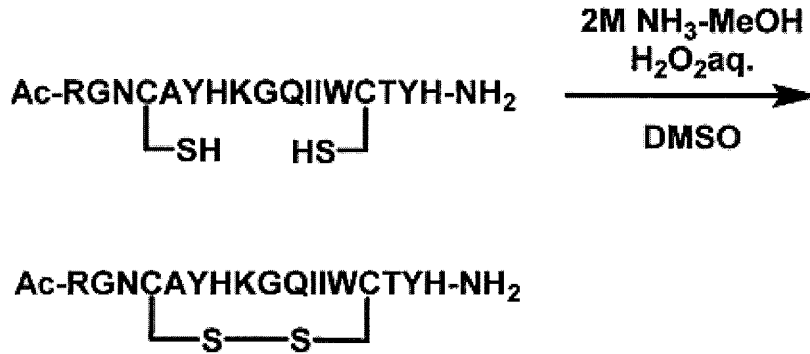
【0377】

MS (ESI) m/z : z = 3 698.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 532.80 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0378】

(1-2) Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHKGQIIWCT<sup>1</sup>YH-NH<sub>2</sub> (配列番号5) 4位と1  
4位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化50】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号5である。

【0379】

(1-1)で合成したペプチド(215mg, 103μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(33.3mg, 15.9μmol)を得た。

20

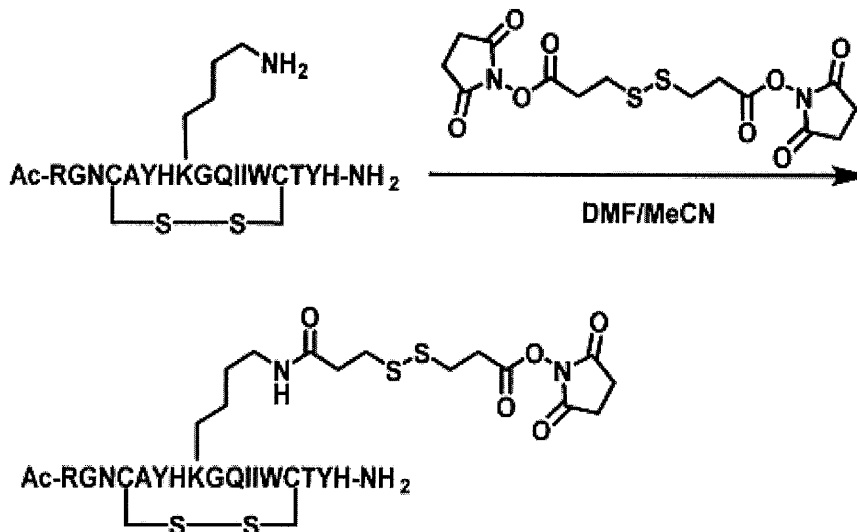
【0380】

MS(ESI) m/z: z = 3 697.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 523.35 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0381】

(1-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化51】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号5である。

【0382】

(1-2)で合成したAc-RGNCA<sup>4</sup>YHKGQIIWCT<sup>1</sup>YH-NH<sub>2</sub> (配列番号5) (33.3mg, 15.9μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド

50

(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(257 mg, 636 μmol)をアセトニトリル(1.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(9.20 mg, 3.87 μmol)を得た。

【0383】

MS (ESI) m/z : z = 3 793.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 79%

【0384】

(1-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(1-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152600にピークが確認された。

【0385】

(1-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(1-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0386】

(1-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC(Hydrophobic Interaction Chromatography(疎水性相互作用クロマトグラフィー))-UPLC解析

(1-5)で生成した糖鎖切断を行っていない抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0387】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料 ;

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体 30等量 ;

【0388】

Retention Time 11.3913分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図5)。

【0389】

10

20

30

40

50



## [ 実施例 2 : トラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング ]

## ( 2 - 1 ) トラスツズマブのチオール導入体の消化酵素による処理

実施例 1 の ( 1 - 3 ) で得られた抗体・ペプチド複合体を PNGase F ( New England Biolabs 社製 ) により糖鎖切断を行った後、ペプチドマッピングを行った。1.5 mL 低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を 10  $\mu$ L、50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液、40% トリフルオロエタノールに溶解した 20 mM のジチオスレイトール水溶液 10  $\mu$ L を加えて 65  $^{\circ}$ C で 1 時間加温後、50 mM のヨードアセトアミド水溶液 10  $\mu$ L を添加し、遮光下室温で 30 分間 300 rpm で振盪し反応させた。反応後、50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液を 40  $\mu$ L 加えて攪拌し、20 ng /  $\mu$ L のトリプシン水溶液 10  $\mu$ L、もしくは 200 ng /  $\mu$ L の Glu - C プロテアーゼ水溶液 12.5  $\mu$ L を添加して 37  $^{\circ}$ C で 18 時間酵素消化した。消化後、20% トリフルオロ酢酸水溶液をトリプシン消化サンプルには 2  $\mu$ L、Glu - C プロテアーゼ消化サンプルには 2.12  $\mu$ L 添加し反応を止め、LC - MS / MS 測定を実施した。

10

## 【 0390 】

## ( 2 - 2 ) トラスツズマブの LC - MS / MS 測定条件

## ( 分析装置 )

ナノ HPLC : EASY - nLC 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

質量分析計 : トライブリッド質量分析計 Orbitrap Fusion (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

20

## 【 0391 】

## ( HPLC 分析条件 )

トラップカラム : Acclaim PepMap (登録商標) 100, 75  $\mu$ m x 2 cm (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

分析カラム : ESI - column (NTCC - 360 / 75 - 3 - 125, 75  $\mu$ m x 12.5 cm, 3  $\mu$ m (日京テクノス株式会社))

移動相 A : 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B : 0.1% ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液 : 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液

流速 : 300 nL / min

サンプル注入量 : 1  $\mu$ L

グラジエント条件 ( B % ) : 2% ( 0.0 - 0.5 分 )、2%  $\rightarrow$  30% ( 0.5 - 23.5 分 )、30%  $\rightarrow$  75% ( 23.5 - 25.5 分 )、75% ( 25.5 - 35.0 分 )

30

## 【 0392 】

## ( 質量分析計分析条件 )

イオン化法 : ESI, Positive モード

スキャンタイプ : Data Dependent Acquisition

Activation Type : Collision Induced Dissociation (CID)

データの取得は付属ソフトである Xcalibur 3.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) および Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて行った。

40

## 【 0393 】

## ( 2 - 3 ) トラスツズマブの修飾部位の解析条件

LC - MS / MS 測定結果に対する修飾部位解析については、Proteome Discoverer version 1.4 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて行った。

## 【 0394 】

Proteome Discoverer での解析は、Sequest HT を検索エン

50

ジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を350~5000Daとした。また、トリプシンもしくはGlu-Cプロテアーゼを消化酵素として設定し、Maximum Missed Cleavage Sitesは3とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンのMass Toleranceは、それぞれ5ppmおよび0.5Daとした。Static Modificationにはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl(+57.021Da)を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニンの酸化(+15.995Da)およびリジン残基への修飾体(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。

10

## 【0395】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図4に示される(1)、(3)を用いた。

## 【0396】

(2-4)トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 1269.30717、理論値:1269.30273、3価)が観測され(図6)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける248位のリジン残基の修飾を示す、2価のy9に相当するm/z 603.29(理論値:603.30)のプロダクトイオンが確認された(図7-1)。また、Proteome Discovererでの解析により、246位もしくは248位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された(図7-2)。

20

また、トラスツズマブのGlu-Cプロテアーゼ消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を含むアミノ酸16残基からなるペプチド、LLGGPSVFLFPPKPKD(配列番号7)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 619.67299、理論値:619.67112、3価)が観測され(図8)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける246位もしくは248位のリジン残基の修飾を示す、1価のy5に相当するm/z 729.49(理論値:729.36)のプロダクトイオンが確認された(図9-1)。また、Proteome Discovererでの解析により、246位もしくは248位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された(図9-2)。

30

この結果より、実施例1の(1-3)では抗体上、重鎖のEUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

40

## 【0397】

[実施例3:トラスツズマブ・ペプチド複合体のジスルフィドリンカー切断、および再酸化、蛍光標識化およびそれらの生成物の解析]

(3-1)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化、およびそれらの生成物のESI-TOFMSによる解析

まず、実施例1の(1-4)で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体1.9mgを60mMリン酸バッファー(pH7.0)に溶解し、18μMとした後、10mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン 51.4μL(トラスツズマブ・ペプチド複合体に対して40等量)を添加し室温で1時間攪拌して、リンカー中のジスルフィド結合を切断した。

50

## 【0398】

次に、リンカー中のジスルフィド結合とともに切断された抗体中のジスルフィド結合を再度結合させるため、再酸化の工程を行った (Jagath R Junutula et al., NATURE BIOTECHNOLOGY, 26(8), 925-932 (2008))。具体的には、反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファー (pH7.0) へと溶媒置換し、トラスツズマブ・ペプチド複合体の濃度を18 $\mu$ Mとした後、10mM デヒドロアスコルビン酸 48.6 $\mu$ L (トラスツズマブ・ペプチド複合体に対して40等量) 加えて3時間攪拌することにより、再酸化を行った。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物はチオプロピオニル基が二つ導入された145329にピークが観測された。

10

## 【0399】

次に、位置選択的に導入されたチオプロピオニル基に対して蛍光標識を行った。チオプロピオニル基が導入されたトラスツズマブを9.57mM PBSバッファー (pH7.0) へと溶媒置換し、トラスツズマブ・ペプチド複合体の濃度を18 $\mu$ Mとした後、5mM フルオレセイン-5-マレイミド 6.8 $\mu$ L (トラスツズマブ・チオプロピオニル基導入体に対して10等量) 加えて2時間攪拌することにより、蛍光標識化を行った。生成したトラスツズマブ蛍光標識体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L (抗体に対して等量) を加えて、室温で20分攪拌し、ESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のトラスツズマブ・チオプロピニルは50682、50844に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に蛍光標識体が導入された51109、51272および、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。なお、生成物の測定の際には重鎖原料の50682、50844のピークは消失したことから、フルオレセイン-5-マレイミドは全ての重鎖と反応したと考えられる。本結果より実際のADCを合成した際もDAR (Drug Antibody Ratio、抗体薬物比) 2.0で制御できると考えられる。

20

## 【0400】

(3-2) リンカー切断、再酸化後のHIC-UPLC解析

(3-1) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

30

## 【0401】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

- a: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;
- b: トラスツズマブ+リンカー切断、再酸化後サンプル;

## 【0402】

Retention Time 12.7157分はペプチドがトラスツズマブに2個ペプチドが導入された化合物であり、11.2909分はペプチドがトラスツズマブに2個チオプロピオニル基が導入された化合物である (図10)。

40

## 【0403】

[実施例4: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(4-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q I V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号8) のペプチドを実施例1 (1-1) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 (63.2mg, 30.4 $\mu$ mol) を得た。

50

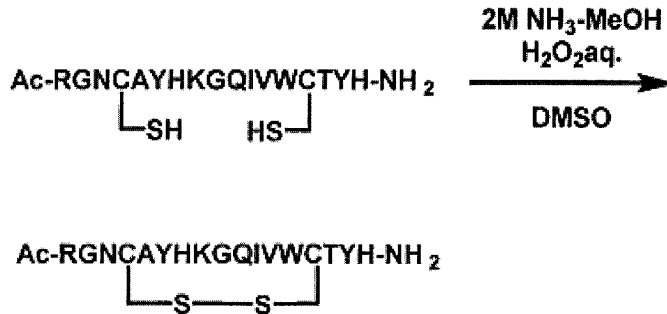
【0404】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  693.35  $[M + 3H]^3+$ ,  $z = 4$  520.30  $[M + 4H]^4+$

【0405】

(4-2) Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHKGQIVWCT<sup>1</sup>YH-NH<sub>2</sub> (配列番号8) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化52】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号8である。

【0406】

(4-1)で合成したペプチド(63.2mg, 30.4μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(25.3mg, 12.2μmol)を得た。

20

【0407】

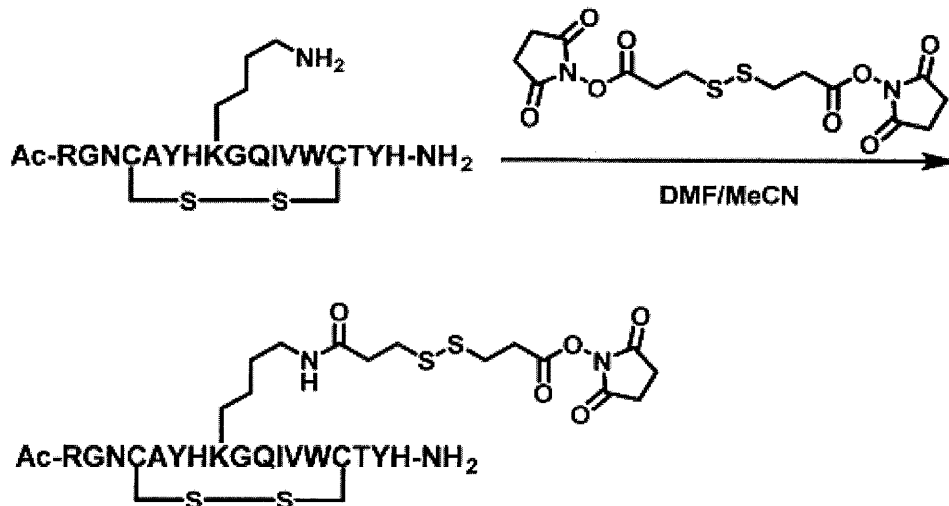
MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  692.70  $[M + 3H]^3+$ ,  $z = 4$  520.30  $[M + 4H]^4+$

30

【0408】

(4-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化53】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号8である。

【0409】

(4-2)で合成したAc-RGNCA<sup>4</sup>YHKGQIVWCT<sup>1</sup>YH-NH<sub>2</sub> (配列番号

50

8) (25.3 mg, 12.2  $\mu\text{mol}$ 、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(197 mg, 488  $\mu\text{mol}$ )をアセトニトリル(1.50 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(6.0 mg, 2.54  $\mu\text{mol}$ )を得た。

10

【0410】

MS(ESI) m/z: z = 3 789.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 89%

【0411】

(4-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(4-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500  $\mu\text{g}$ を60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9  $\mu\text{L}$ に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$ (抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150314にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152568にピークが確認された。

20

【0412】

(4-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(4-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$ (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0413】

(4-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(4-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5  $\mu\text{m}$ を使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【0414】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0415】

Retention Time 10.6944分はペプチドが1個導入された化合物11.3287分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図11)。

50

## 【0416】

(4-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(4-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

## 【0417】

[実施例5：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(5-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q V V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号9)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(69.3 mg, 33.6 μmol)を得た。

## 【0418】

MS (ESI) m/z : z = 3 688.80 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 516.85 [M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0419】

(5-2) Ac-RGNCA Y H K G Q V V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号9) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化54】



上記アミノ酸配列は、配列番号9である。

## 【0420】

(5-1)で合成したペプチド(69.3 mg, 33.6 μmol)をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(35.8 mg, 17.3 μmol)を得た。

## 【0421】

MS (ESI) m/z : z = 3 688.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 516.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0422】

(5-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

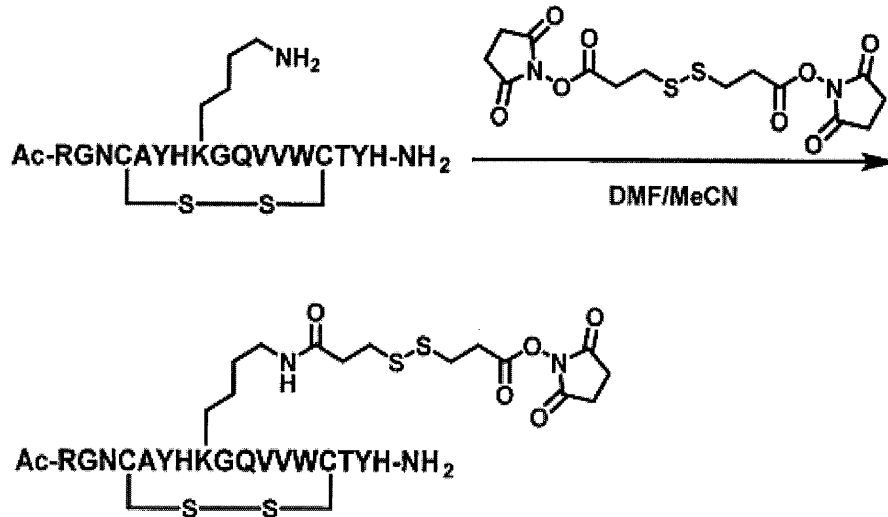
20

30

40

50

## 【化55】



上記アミノ酸配列は、配列番号9である。

## 【0423】

(5-2)で合成したAc-RGNCAYHKGQVWVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号9) (35.8 mg, 17.3 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(280 mg, 692 μmol)をアセトニトリル(2.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(5.5 mg, 2.34 μmol)を得た。

## 【0424】

MS(ESI) m/z: z = 3 784.55 [M + 3H]<sup>3+</sup>  
HPLC純度: 71%

## 【0425】

(5-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(5-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150314にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152568にピークが確認された。

## 【0426】

(5-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(5-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50

756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50683、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0427】

(5-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(5-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0428】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0429】

Retention Time 10.1410分はペプチドが1個導入された化合物10.7091分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図12)。

【0430】

20

(5-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(5-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0431】

[実施例6: トラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング]

(6-1) トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

実施例5の(5-3)で得られた抗体・ペプチド複合体をPNGase F (New England Biolabs社製)により糖鎖切断を行った後、ペプチドマッピングを行った。1.5 mL低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を10 μL、50 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液、40%トリフルオロエタノールに溶解した20 mMのジチオスレイトール水溶液10 μLを加えて65で1時間加熱後、50 mMのヨードアセトアミド水溶液10 μLを添加し、遮光下室温で30分間300 rpmで振盪し反応させた。反応後、50 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を40 μL加えて攪拌し、20 ng/μLのトリプシン水溶液を10 μL添加して37で18時間酵素消化した。消化後、20%トリフルオロ酢酸水溶液を2 μL添加し反応を止め、LC-MS/MS測定を実施した。

30

【0432】

(6-2) トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(分析装置)

40

ナノHPLC: EASY-nLC 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

質量分析計: トライブリッド質量分析計Orbitrap Fusion (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

【0433】

(HPLC分析条件)

トラップカラム: Accclaim PepMap (登録商標) 100, 75 μm x 2 cm (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

分析カラム: ESI-column (NTCC-360/75-3-125, 75 μm x 12.5 cm, 3 μm (日京テクノス株式会社))

50



移動相 A : 0 . 1 % ギ酸水溶液

移動相 B : 0 . 1 % ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液 : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸水溶液

流速 : 3 0 0 n L / m i n

サンプル注入量 : 1  $\mu$  L

グラジエント条件 ( B % ) : 2 % ( 0 . 0 - 0 . 5 分 )、2 % 3 0 % ( 0 . 5 - 2 3 . 5 分 )、3 0 % 7 5 % ( 2 3 . 5 - 2 5 . 5 分 )、7 5 % ( 2 5 . 5 - 3 5 . 0 分 )

#### 【 0 4 3 4 】

( 質量分析計分析条件 )

イオン化法 : E S I , P o s i t i v e モード

スキャンタイプ : D a t a D e p e n d e n t A q u i s i t i o n

A c t i v a t i o n T y p e : C o l l i s i o n I n d u c e d D i s s o c i a t i o n ( C I D )

データの取得は付属ソフトである X c a l i b u r 3 . 0 ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) および T h e r m o O r b i t r a p F u s i o n T u n e A p p l i c a t i o n 2 . 0 ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) を用いて行った。

#### 【 0 4 3 5 】

( 6 - 3 ) トラスツズマブの修飾部位の解析条件

L C - M S / M S 測定結果に対する修飾部位解析については、P r o t e o m e D i s c o v e r e r v e r s i o n 1 . 4 ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) を用いて行った。

#### 【 0 4 3 6 】

P r o t e o m e D i s c o v e r e r での解析は、S e q u e s t H T を検索エンジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を 3 5 0 ~ 5 0 0 0 D a、T o t a l I n t e n s i t y T h r e s h o l d を 5 0 0 0 0 とした。また、トリプシンを消化酵素として設定し、M a x i m u m M i s s e d C l e a v a g e S i t e s は 3 とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンの M a s s T o l e r a n c e は、それぞれ 5 p p m および 0 . 5 D a とした。S t a t i c M o d i f i c a t i o n にはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、C a r b a m i d o m e t h y l ( + 5 7 . 0 2 1 D a ) を設定した。D y n a m i c M o d i f i c a t i o n s については、メチオニンの酸化 ( + 1 5 . 9 9 5 D a ) およびリジン残基への修飾体 ( ヨードアセトアミドによる C a r b a m i d o m e t h y l 化を受けたチオール導合体 ( + 1 4 5 . 0 1 9 D a ) ) を設定した。さらに、P e p t i d e C o n f i d e n c e が H i g h のもののみとなるようフィルターをかけた。

#### 【 0 4 3 7 】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図 4 に示される ( 1 )、( 3 ) を用いた。

#### 【 0 4 3 8 】

( 6 - 4 ) トラスツズマブの L C - M S / M S による修飾部位の解析結果

L C - M S / M S を用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 ( ヨードアセトアミドによる C a r b a m i d o m e t h y l 化を受けたチオール導合体 ( + 1 4 5 . 0 1 9 D a ) ) を含むアミノ酸 3 3 残基からなるペプチド、T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R ( 配列番号 6 ) のペプチドフラグメントの M S スペクトル ( 実測値 : m / z 9 5 2 . 2 3 1 7 0、理論値 : 9 5 2 . 2 2 9 0 0、4 価 ) が観測され ( 図 1 3 )、C I D スペクトルより重鎖の E U n u m b e r i n g における 2 4 6 位もしくは 2 4 8 位のリジン残基の修飾を示す、2 価の y 2 0 に相当する m / z 1 1 6 6 . 8 8 ( 理論値 : 1 1 6 6 . 6 1 ) のプロダクトイオンが確認された ( 図 1 4 - 1 )。また、P r o t e o m e D i s c o v e r e r での解析により、2 4 6 位もしくは 2 4 8 位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっ

10

20

30

40

50

ていることが示された(図14-2)。この結果より、実施例5の(5-3)では抗体上、重鎖上EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【0439】

[実施例7：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(7-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKGQAVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号10)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(73.1mg, 35.9 μmol)を得た。

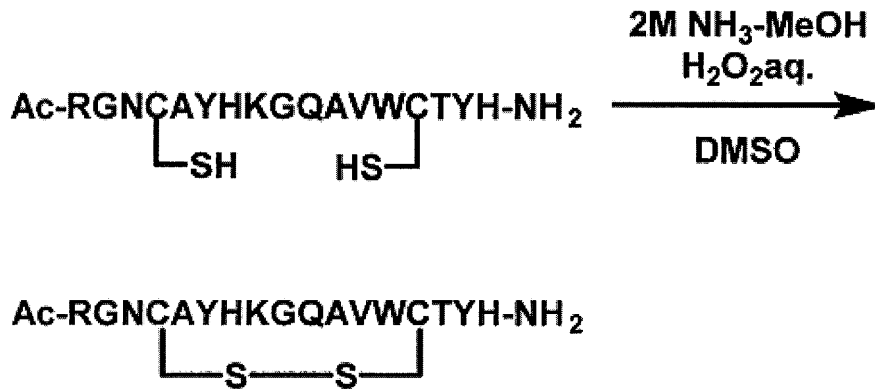
【0440】

MS(ESI) m/z : z = 3 674.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 506.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0441】

(7-2) Ac-RGNCA YHKGQAVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号10)4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化56】



上記アミノ酸配列は、配列番号10である。

【0442】

(7-1)で合成したペプチド(73.1mg, 35.9 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(30.5mg, 15.0 μmol)を得た。

【0443】

MS(ESI) m/z : z = 3 678.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 509.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0444】

(7-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

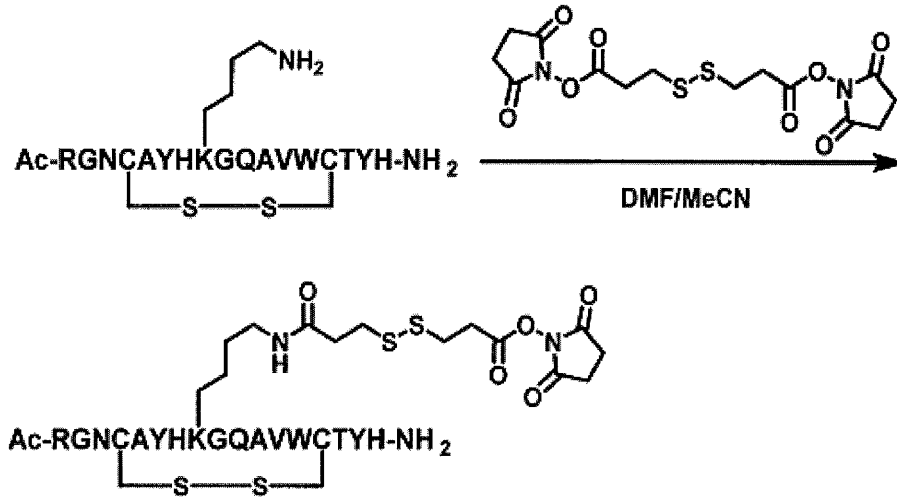
20

30

40

50

## 【化57】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号10である。

## 【0445】

(7-2)で合成したAc-RGNCA YHKGQAVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号10) (30.5 mg, 15.0 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (243 mg, 600 μmol)をアセトニトリル(1.50 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(5.4 mg, 2.32 μmol)を得た。

20

## 【0446】

MS (ESI) m/z : z = 3 775.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 89%

30

## 【0447】

(7-4)抗HER2 IgG抗体トラスツマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(7-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150268にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152630にピークが確認された。

40

## 【0448】

(7-5)トラスツマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(7-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオ

50

ニル基が導入された50683、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0449】

(7-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(7-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0450】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0451】

Retention Time 10.2505分はペプチドが1個導入された化合物10.7621分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図15)。

【0452】

(7-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

20

実施例3の(3-1)記載の方法により、(7-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0453】

[実施例8: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(8-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKGQLLWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号11)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(30.3 mg, 14.5 μmol)を得た。

30

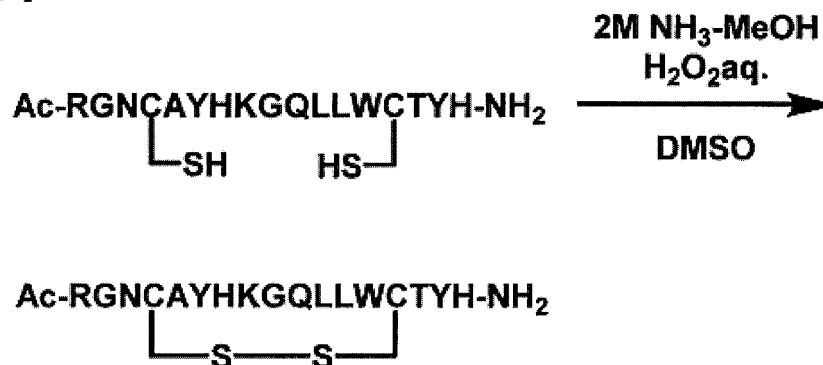
【0454】

MS (ESI) m/z: z = 3 698.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 532.80 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0455】

(8-2) Ac-RGNCA YHKGQLLWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号11) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化58】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号11である。

50

## 【0456】

(8-1)で合成したペプチド(30.3 mg, 14.5 μmol)をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(11.9 mg, 5.70 μmol)を得た。

10

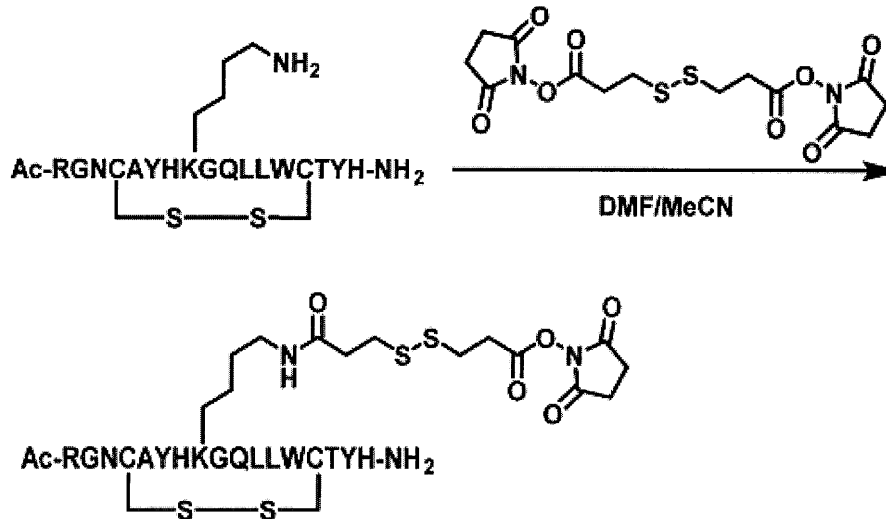
## 【0457】

MS(ESI) m/z: z = 3 697.35 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 523.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0458】

(8-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化59】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号11である。

## 【0459】

(8-2)で合成したAc-RGNCAYHKGQLLWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号11)(11.9 mg, 5.70 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(92 mg, 2.28 μmol)をアセトニトリル(1.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(6.0 mg, 2.52 μmol)を得た。

40

## 【0460】

MS(ESI) m/z: z = 3 793.85 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 75%

## 【0461】

(8-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSに

50

よる解析

(8-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148073にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150495にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152752にピークが確認された。

【0462】

(8-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(8-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0463】

(8-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(8-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0464】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0465】

Retention Time 10.4200分はペプチドが1個導入された化合物11.0303分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図16)。

【0466】

(8-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(8-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0467】

[実施例9:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(9-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q L I W C T Y H - NH<sub>2</sub>(配列番号12)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(40.0mg, 19.1μmol)を得た。

【0468】

10

20

30

40

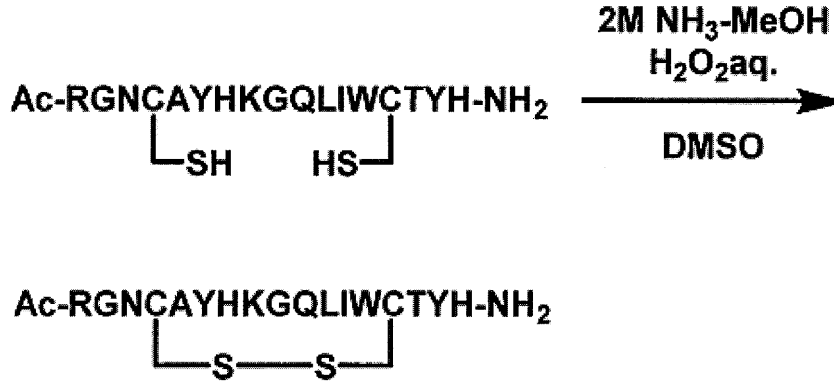
50

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3 \quad 698.10 [M + 3H]^3+$ ,  $z = 4 \quad 532.80 [M + 4H]^4+$

【0469】

(9-2) Ac-RGNCA<sup>Y</sup>HKGQLIWCT<sup>Y</sup>H-NH<sub>2</sub> (配列番号12) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化60】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号12である。

【0470】

(9-1) で合成したペプチド (40.0 mg, 19.1  $\mu$ mol) を DMSO に溶解し 100 mM とした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量 加え室温で 20 時間 攪拌 を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (13.5 mg, 6.46  $\mu$ mol) を得た。

20

【0471】

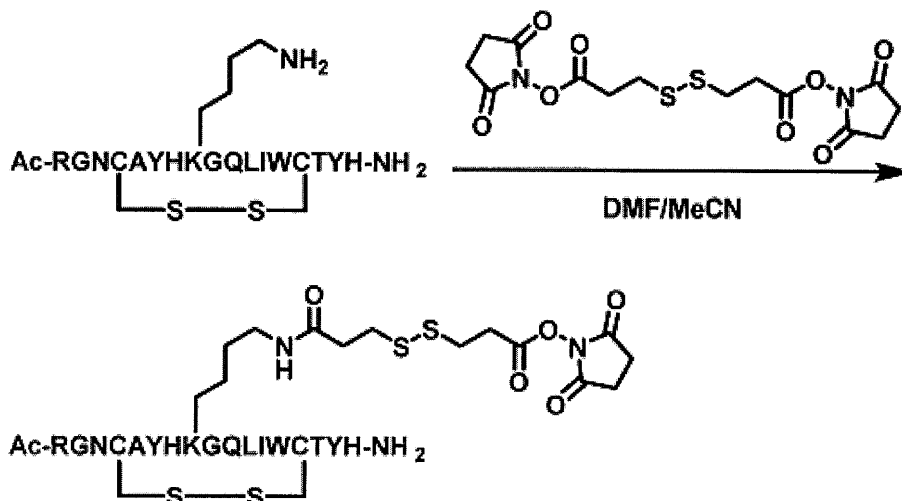
MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3 \quad 697.40 [M + 3H]^3+$ ,  $z = 4 \quad 523.30 [M + 4H]^4+$

30

【0472】

(9-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化61】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号12である。

【0473】

50

(9-2)で合成したAc-RGNCAYHKGQLIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号12) (13.5 mg, 6.46 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(104 mg, 258 μmol)をアセトニトリル(1.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(5.5 mg, 2.31 μmol)を得た。

【0474】

MS (ESI) m/z : z = 3 793.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 90%

【0475】

(9-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(9-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152758にピークが確認された。

【0476】

(9-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(9-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0477】

(9-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(9-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 × 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0478】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

【0479】

Retention Time 11.2883分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図17)。

10

20

30

40

50



## 【0480】

(9-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(9-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

## 【0481】

[実施例10：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(10-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCA Y H K G Q I V W C T - N H <sub>2</sub> (配列番号13)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(314mg, 200 μmol)を得た。

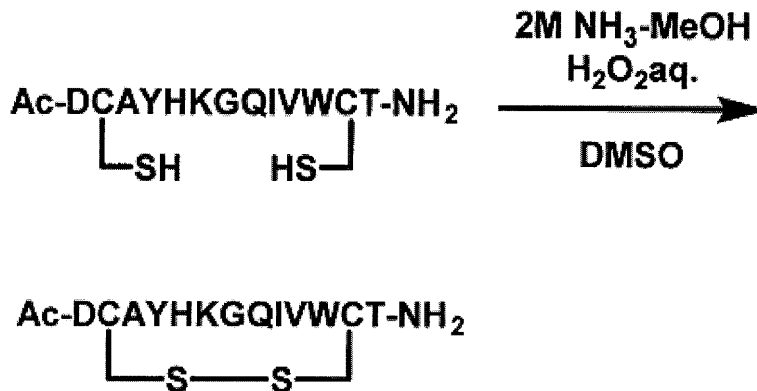
## 【0482】

MS (ESI) m/z : z = 2 783 . 30 [M + 2H]<sup>2+</sup>

## 【0483】

(10-2) Ac-DCA Y H K G Q I V W C T - N H <sub>2</sub> (配列番号13) 2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化62】



上記アミノ酸配列は、配列番号13である。

## 【0484】

(10-1)で合成したペプチド(314mg, 200 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(47.8mg, 30.6 μmol)を得た。

## 【0485】

MS (ESI) m/z : z = 2 782 . 20 [M + 2H]<sup>2+</sup>

## 【0486】

(10-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

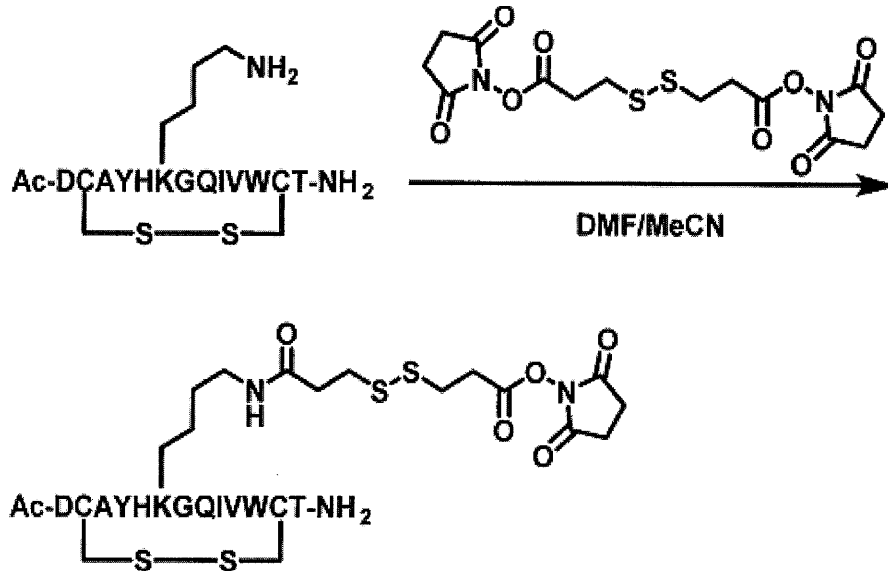
20

30

40

50

## 【化63】



上記アミノ酸配列は、配列番号13である。

## 【0487】

(10-2)で合成したAc-DCA YHKGQIVWCT-NH<sub>2</sub> (配列番号13) (47.8 mg, 30.6 μmol、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(493 mg, 1.22 mmol)をアセトニトリル(2.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(14.0 mg, 7.59 μmol)を得た。

## 【0488】

MS (ESI) m/z : z = 2 926.70 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC純度 : 90%

## 【0489】

(10-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(10-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152053にピークが確認された。

## 【0490】

(10-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(10-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、5

0756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0491】

(10-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(10-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0492】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0493】

Retention Time 12.9609分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図18)。

【0494】

(10-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(10-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E NumberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【0495】

[実施例11: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(11-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCA Y H K G Q V V W C T - NH<sub>2</sub> (配列番号14)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(180 mg, 116 μmol)を得た。

30

【0496】

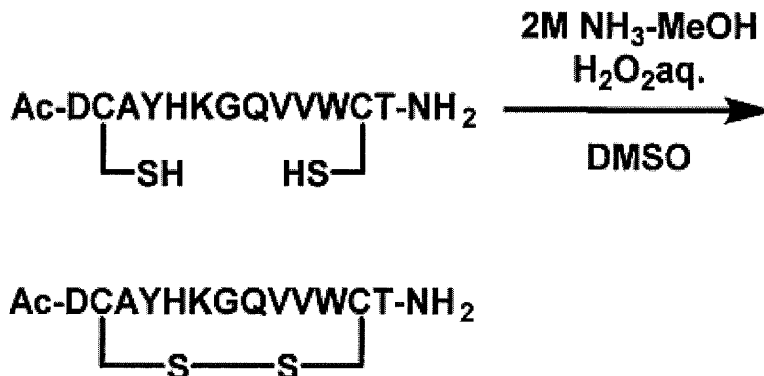
MS (ESI) m/z: z = 1 1551.0 [M + H]<sup>+</sup>, z = 2 776.30 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【0497】

(11-2) Ac-DCA Y H K G Q V V W C T - NH<sub>2</sub> (配列番号14) 2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化64】

40



50

上記アミノ酸配列は、配列番号14である。

【0498】

(11-1)で合成したペプチド(180 mg, 116  $\mu\text{mol}$ )をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M  $\text{NH}_3$ -MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(36.4 mg, 23.5  $\mu\text{mol}$ )を得た。

10

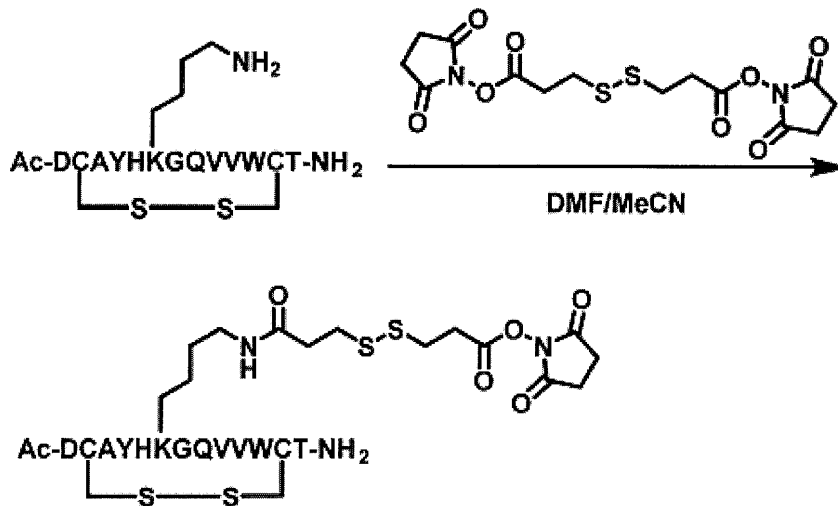
【0499】

MS(ESI)  $m/z$ :  $z = 1$  1549.95  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $z = 2$  775.30  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

【0500】

(11-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化65】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号14である。

【0501】

(11-2)で合成したAc-DCAYHKGQVWVWCT-NH<sub>2</sub>(配列番号14)(36.4 mg, 23.5  $\mu\text{mol}$ 、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.50 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(380 mg, 0.94 mmol)をアセトニトリル(2.50 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(16.0 mg, 8.70  $\mu\text{mol}$ )を得た。

40

【0502】

MS(ESI)  $m/z$ :  $z = 2$  919.95  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

HPLC純度: 90%

【0503】

(11-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS

50

による解析

(11-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が149220にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151861にピークが確認された。

【0504】

(11-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(11-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0505】

(11-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(11-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0506】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0507】

Retention Time 11.1071分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.5114分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図19)。

【0508】

(11-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(11-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0509】

[実施例12:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(12-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCA Y H K G Q A V W C T - NH<sub>2</sub>(配列番号15)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(158mg, 104μmol)を得た。

【0510】

10

20

30

40

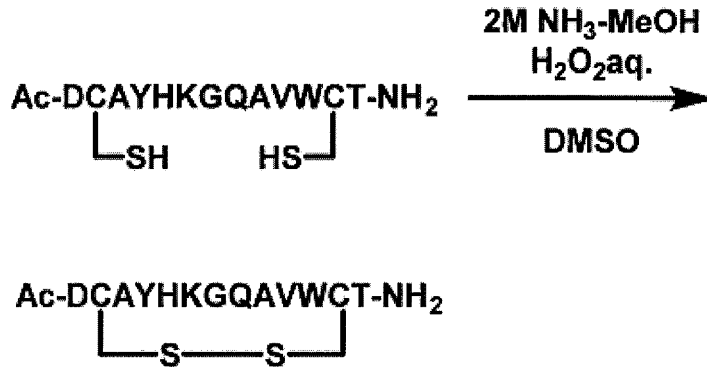
50

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 1$  1523.95  $[M+H]^+$ ,  $z = 2$  762.25  $[M+2H]^{2+}$

【0511】

(12-2) Ac-DCA<sup>Y</sup>HKGQAVWCT-NH<sub>2</sub> (配列番号15) 2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化66】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号15である。

【0512】

(12-1) で合成したペプチド (158 mg, 104  $\mu\text{mol}$ ) を DMSO に溶解し 100 mM とした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量 加え室温で 20 時間 攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (26.7 mg, 17.6  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

20

【0513】

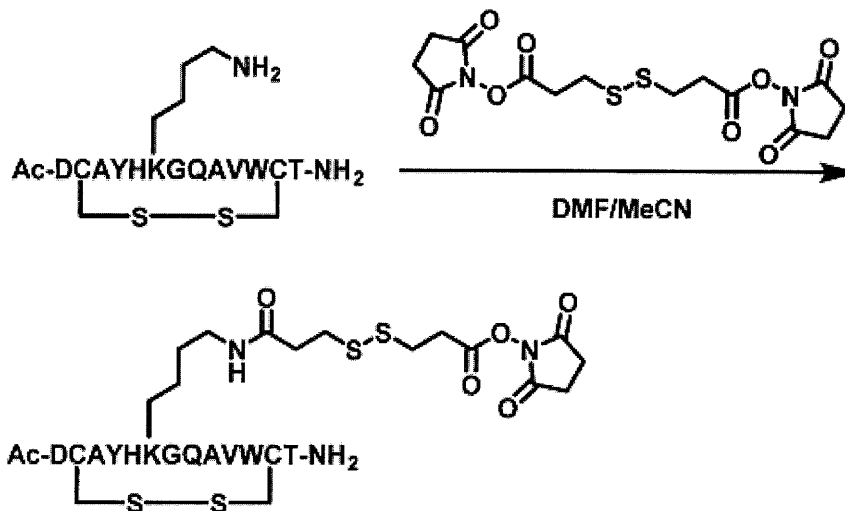
MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 1$  1521.80  $[M+H]^+$ ,  $z = 2$  761.20  $[M+2H]^{2+}$

30

【0514】

(12-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化67】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号15である。

【0515】

50

(12-2)で合成したAc-DCA Y H K G Q A V W C T - N H <sub>2</sub> (配列番号15) (26.7 mg, 17.6 μmol、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.50 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(380 mg, 0.94 mmol)をアセトニトリル(2.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(6.50 mg, 3.59 μmol)を得た。

10

【0516】

MS (ESI) m/z : z = 2 906.10 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC純度 : 93%

【0517】

(12-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(12-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が148897にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151619にピークが確認された。

20

【0518】

(12-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(12-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50684、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0519】

(12-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(12-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【0520】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

【0521】

Retention Time 10.8489分はペプチドがトラスツズマブに1個導

50

入された化合物、11.7649分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図20)。

【0522】

(12-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(12-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0523】

[実施例13: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(13-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K S Q I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号16)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(20.0mg, 9.43 μmol)を得た。

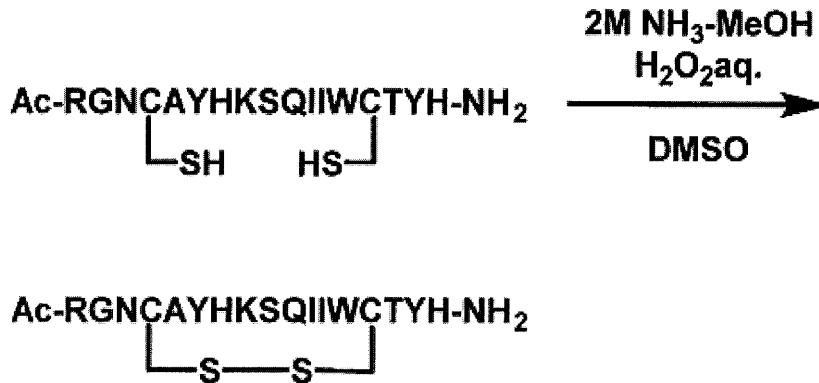
【0524】

MS (ESI) m/z: z = 3 708.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 531.35 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0525】

(13-2) Ac-RGNCA Y H K S Q I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号16) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化68】



上記アミノ酸配列は、配列番号16である。

【0526】

(13-1)で合成したペプチド(20.0mg, 9.43 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(12.0mg, 5.66 μmol)を得た。

【0527】

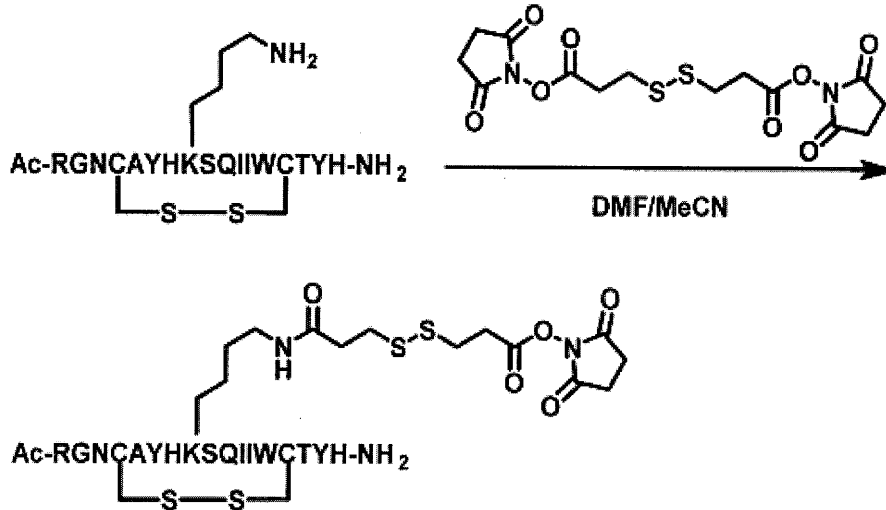
MS (ESI) m/z: z = 3 707.50 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 530.85 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0528】

(13-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結



【化69】



上記アミノ酸配列は、配列番号16である。

【0529】

(13-2)で合成したAc-RGNCAYHKSQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号16) (12.0 mg, 5.66 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (45.7 mg, 113 μmol)をアセトニトリル(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(3.20 mg, 1.33 μmol)を得た。

【0530】

MS (ESI) m/z : z = 3 803.80 [M + 3H]<sup>3+</sup>  
HPLC純度 : 92%

【0531】

(13-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(13-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152864にピークが確認された。

【0532】

(13-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(13-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

10

20

30

40

50

オニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0533】

(13-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(13-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

10

【0534】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0535】

Retention Time 11.1885分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図21)。

【0536】

(13-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

20

実施例3の(3-1)記載の方法により、(13-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0537】

[実施例14: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(14-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKNQIIWCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号17)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(26.4mg, 12.3 μmol)を得た。

30

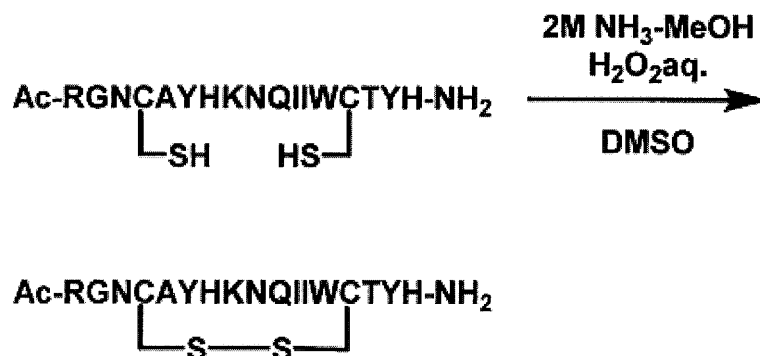
【0538】

MS (ESI) m/z: z = 3 717.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 537.95 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0539】

(14-2) Ac-RGNCA YHKNQIIWCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号17) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化70】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号17である。

50

## 【0540】

(14-1)で合成したペプチド(26.4 mg, 12.3 μmol)をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(13.0 mg, 6.06 μmol)を得た。

10

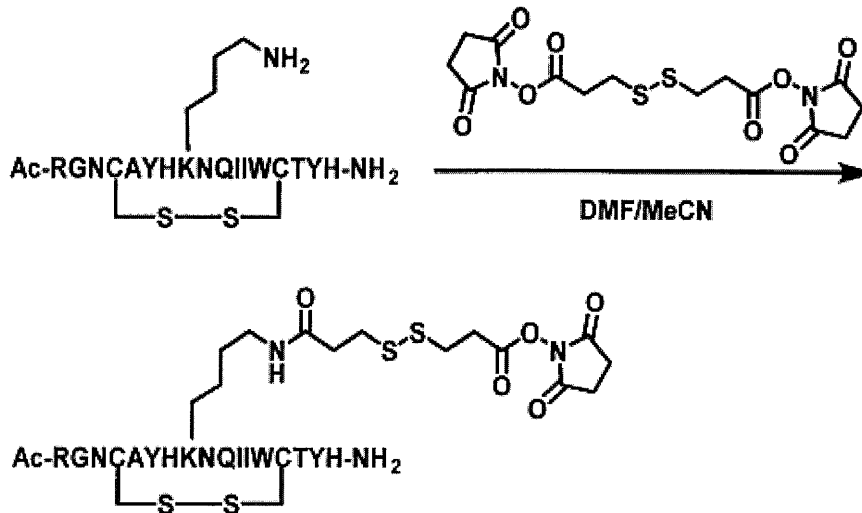
## 【0541】

MS(ESI) m/z: z = 3 716.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 537.55 [M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0542】

(14-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化71】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号17である。

## 【0543】

(14-2)で合成したAc-RGNCAYHKNQIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号17)(13.0 mg, 6.06 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(49.0 mg, 121 μmol)をアセトニトリル(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(1.30 mg, 0.53 μmol)を得た。

40

## 【0544】

MS(ESI) m/z: z = 3 812.85 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 100%

## 【0545】

(14-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS

50

による解析

(14-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150549にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152869にピークが確認された。

【0546】

(14-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(14-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0547】

(14-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(14-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0548】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0549】

Retention Time 9.8295分はトラスツズマブ原料、10.7107分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.4407分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図22)。

【0550】

(14-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(14-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0551】

[実施例15:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(15-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKDQ I IWCT YH-NH<sub>2</sub>(配列番号18)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(37.2mg, 17.3μmol)を得た。

【0552】

10

20

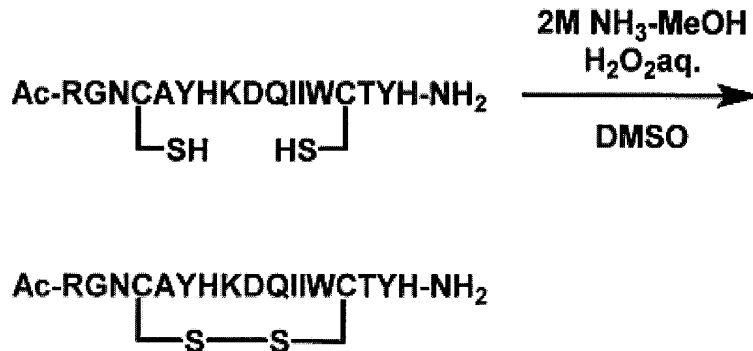
30

40

50

MS (ESI)  $m/z : z = 4 \quad 538.20 [M + 4H]^{4+}$   
 【0553】

(15-2) Ac-RGNCA<sup>Y</sup>HKDQIIWCT<sup>Y</sup>H-NH<sub>2</sub> (配列番号18) 4位  
 と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成  
 【化72】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号18である。

【0554】

(15-1) で合成したペプチド (37.2 mg, 17.3 μmol) を DMSO に溶解し 100 mM とした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (17.2 mg, 8.01 μmol) を得た。

20

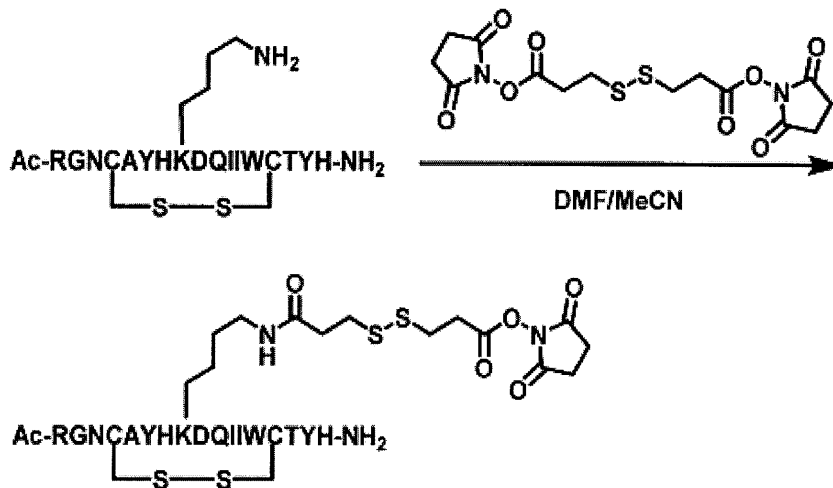
【0555】

MS (ESI)  $m/z : z = 3 \quad 716.75 [M + 3H]^{3+}$ ,  $z = 4 \quad 537.80 [M + 4H]^{4+}$

【0556】

(15-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化73】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号18である。

【0557】

(15-2) で合成した Ac-RGNCA<sup>Y</sup>HKDQIIWCT<sup>Y</sup>H-NH<sub>2</sub> (配列番号18) (17.2 mg, 8.01 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステイ

50

ンは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.30 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(65.0 mg, 160 μmol)をアセトニトリル(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(3.00 mg, 1.23 μmol)を得た。

10

【0558】

MS (ESI) m/z : z = 3 813.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 100%

【0559】

(15-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(15-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152864にピークが確認された。

20

【0560】

(15-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(15-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0561】

(15-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(15-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【0562】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0563】

Retention Time 11.2108分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図23)。

【0564】

(15-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

50

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 1 5 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 0 5 6 5 】

[ 実施例 1 6 : 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

( 1 6 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K Q Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 1 9 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 3 2 . 2 m g , 1 4 . 9 μ m o l ) を得た。

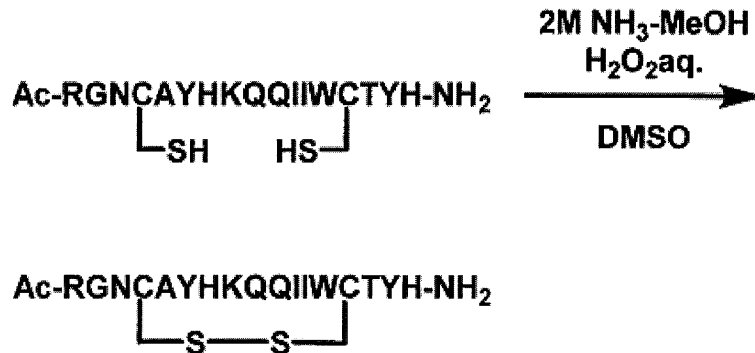
【 0 5 6 6 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 5 4 1 . 5 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【 0 5 6 7 】

( 1 6 - 2 ) A c - R G N C A Y H K Q Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 1 9 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 7 4 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 1 9 である。

【 0 5 6 8 】

( 1 6 - 1 ) で合成したペプチド ( 3 2 . 2 m g , 1 4 . 9 μ m o l ) を D M S O に溶解し 1 0 0 m M とした後、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 1 4 . 3 m g , 6 . 6 2 μ m o l ) を得た。

【 0 5 6 9 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 2 1 . 2 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>, z = 4 5 4 1 . 0 0 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

【 0 5 7 0 】

( 1 6 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

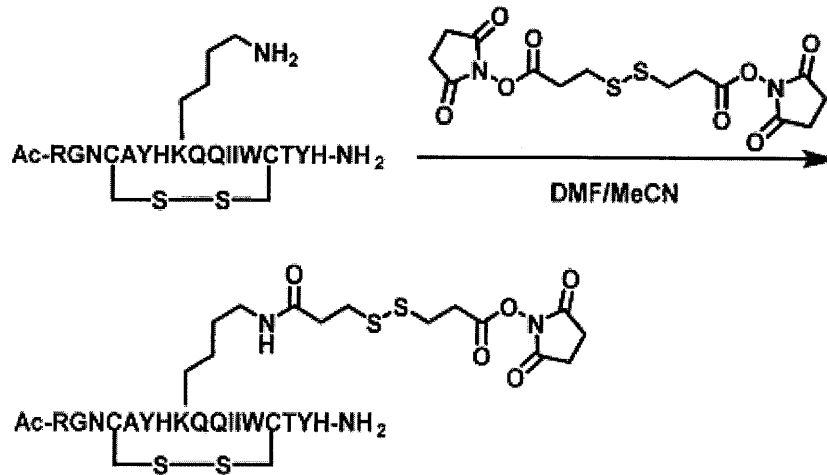
20

30

40

50

## 【化 7 5】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 19 である。

## 【0571】

(16-2) で合成した Ac-RGNCAYHKQI IWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 19) (14.3 mg, 6.62 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.30 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (53.0 mg, 132 μmol) をアセトニトリル (0.30 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (4.00 mg, 1.63 μmol) を得た。

20

## 【0572】

MS (ESI) m/z : z = 3 817.50 [M + 3H]<sup>3+</sup>

30

HPLC 純度 : 89%

## 【0573】

(16-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(16-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150212 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152897 にピークが確認された。

40

## 【0574】

(16-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(16-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50686、50844 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピー

50



クが観測された。

【0575】

(16-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(16-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0576】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0577】

Retention Time 10.7230分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.4259分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図24)

【0578】

(16-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

20

実施例3の(3-1)記載の方法により、(16-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0579】

[実施例17: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(17-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKEQ I IWCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号20)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(38.0 mg, 17.6 μmol)を得た。

30

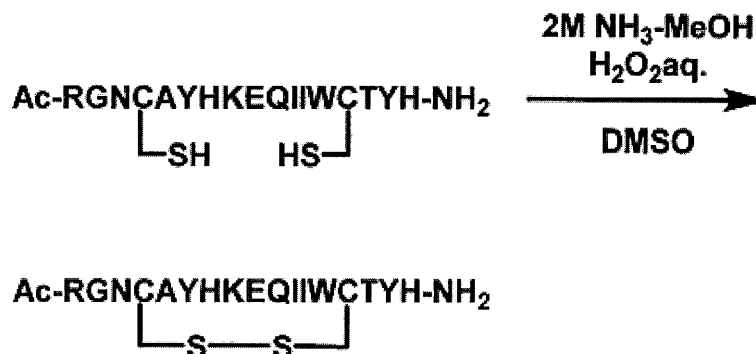
【0580】

MS (ESI) m/z: z = 3 722.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 541.75 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0581】

(17-2) Ac-RGNCA YHKEQ I IWCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号20) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化76】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号20である。

50

## 【0582】

(17-1) で合成したペプチド (38.0 mg, 17.6  $\mu\text{mol}$ ) を DMSO に溶解し 100 mM とした後、2 M  $\text{NH}_3$  - MeOH を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (16.0 mg, 7.40  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

10

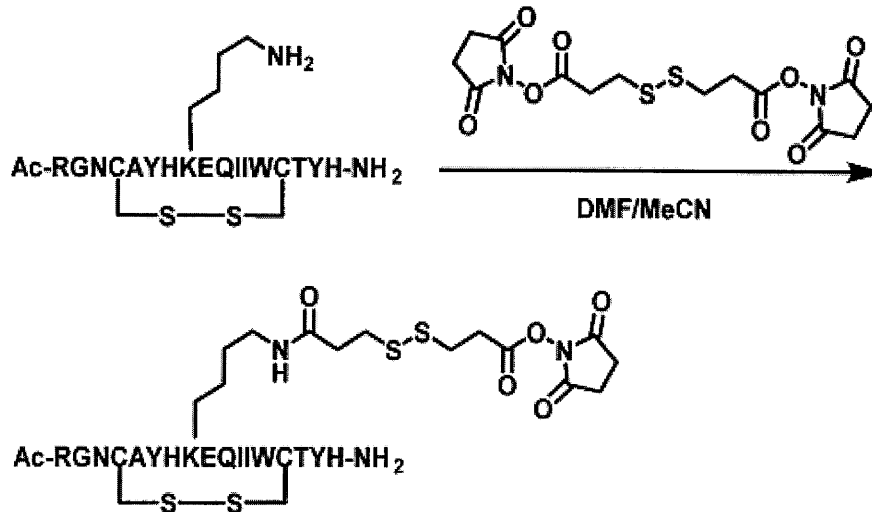
## 【0583】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  721.40  $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ ,  $z = 4$  541.25  $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

## 【0584】

(17-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化77】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 20 である。

## 【0585】

(17-2) で合成した  $\text{Ac-RGNCAYHKEQIIWCTYH-NH}_2$  (配列番号 20) (16.0 mg, 7.40  $\mu\text{mol}$ 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (0.30 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (60.0 mg, 148  $\mu\text{mol}$ ) をアセトニトリル (0.30 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (4.50 mg, 1.84  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

40

## 【0586】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  817.80  $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$

HPLC 純度: 100%

## 【0587】

(17-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

50

(17-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152900にピークが確認された。

【0588】

(17-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(17-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50686、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0589】

(17-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(17-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

20

【0590】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0591】

Retention Time 11.1843分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図25)。

30

【0592】

(17-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(17-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0593】

[実施例18:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

40

(18-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K F Q I I W C T Y H-NH<sub>2</sub>(配列番号21)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(23.0mg, 10.5 $\mu$ mol)を得た。

【0594】

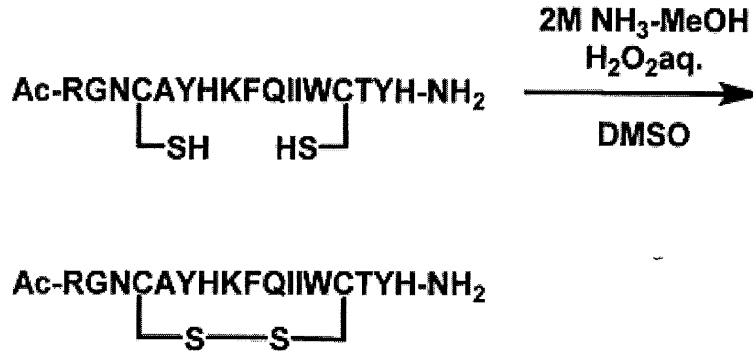
MS(ESI) m/z: z=3 728.05[M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 546.40[M+4H]<sup>4+</sup>

【0595】

50

(18-2) Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHKFQIIWCT<sup>14</sup>YH-NH<sub>2</sub> (配列番号21) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化78】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号21である。

【0596】

(18-1)で合成したペプチド(23.0mg, 10.5μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(9.80mg, 4.50μmol)を得た。

20

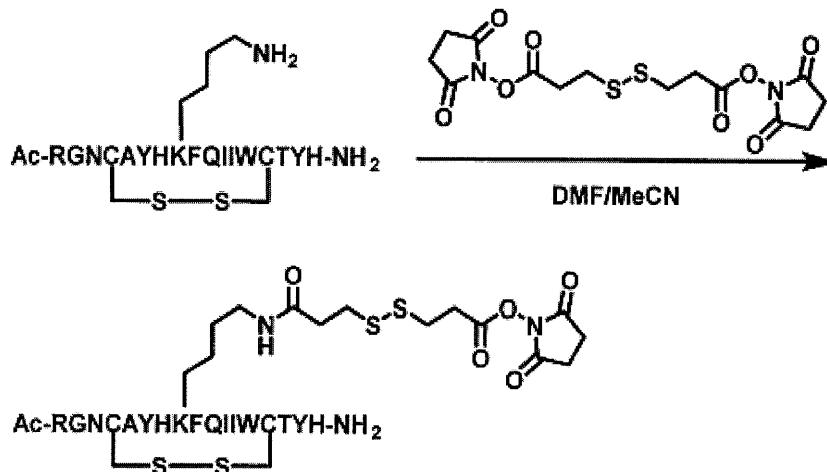
【0597】

MS (ESI) m/z : z = 3 727.35 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 545.85 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0598】

(18-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化79】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号21である。

【0599】

(18-2)で合成したAc-RGNCA<sup>4</sup>YHKFQIIWCT<sup>14</sup>YH-NH<sub>2</sub> (配列番号21) (9.80mg, 4.50μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.30mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (36.0mg, 90.0μmol)をアセトニトリル(0.30mL)に溶解した

50

溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(2.50mg, 1.01 $\mu$ mol)を得た。

【0600】

MS (ESI) m/z : z = 3 823.85 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 93%

10

【0601】

(18-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(18-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153317にピークが確認された。

20

【0602】

(18-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(18-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50686、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0603】

(18-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(18-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0, B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【0604】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0605】

Retention Time 13.8013分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図26)。

【0606】

トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(18-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能

50

である。

【0607】

[実施例19：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(19-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K Y Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号22)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(30.8mg, 14.0 μmol)を得た。

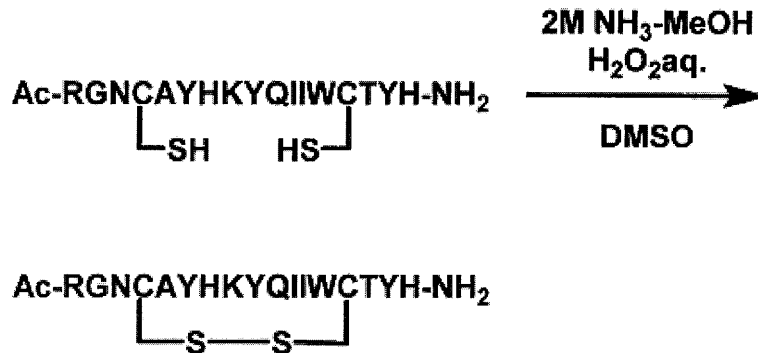
【0608】

MS(ESI) m/z : z = 3 733.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 550.40 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0609】

(19-2) Ac-RGNCA Y H K Y Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号22)4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化80】



上記アミノ酸配列は、配列番号22である。

【0610】

(19-1)で合成したペプチド(30.8mg, 14.0 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(17.5mg, 7.97 μmol)を得た。

【0611】

MS(ESI) m/z : z = 3 732.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 549.90 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0612】

(19-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

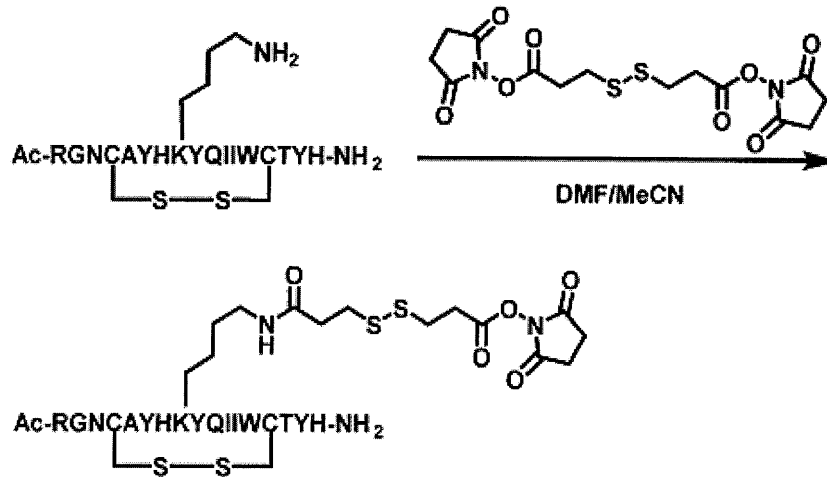
20

30

40

50

## 【化 8 1】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 22 である。

## 【0613】

(19-2) で合成した Ac-RGNCAYHKYQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 22) (17.5 mg, 7.97 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.30 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (97.0 mg, 239 μmol) をアセトニトリル (0.30 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (3.50 mg, 1.41 μmol) を得た。

20

## 【0614】

MS (ESI) m/z : z = 3 829.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 89%

30

## 【0615】

(19-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(19-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152965 にピークが確認された。

40

## 【0616】

(19-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(19-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50686、50844 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピー

50

クが観測された。

【0617】

(19-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(19-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0618】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0619】

Retention Time 13.7628分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図27)。

【0620】

(19-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(19-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【0621】

[実施例20: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(20-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKWQ I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号23)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(23.0 mg, 10.4 μmol)を得た。

30

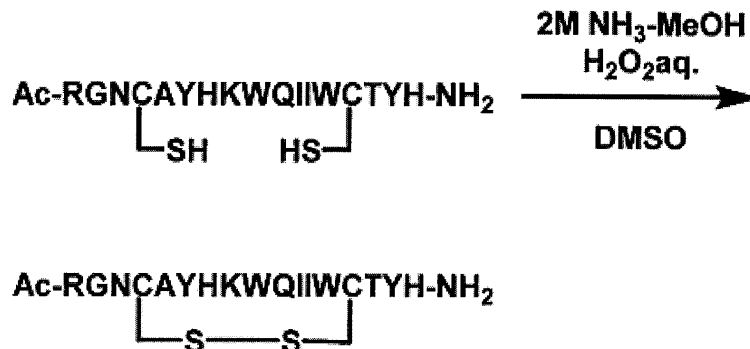
【0622】

MS (ESI) m/z: z = 3 741.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 556.00 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0623】

(20-2) Ac-RGNCA YHKWQ I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号23) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化82】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号23である。

【0624】

50



(20-1)で合成したペプチド(23.0 mg, 10.4  $\mu\text{mol}$ )をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M  $\text{NH}_3$ -MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(8.20 mg, 3.70  $\mu\text{mol}$ )を得た。

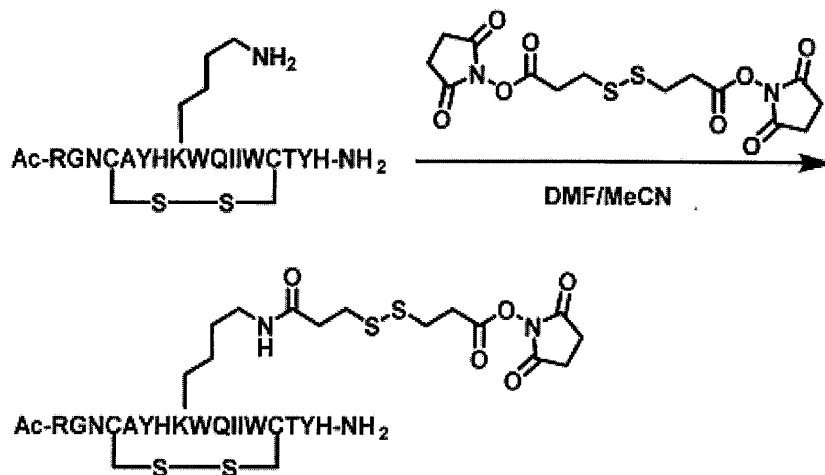
【0625】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  740.40  $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ ,  $z = 4$  555.65  $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

【0626】

(20-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化83】



上記アミノ酸配列は、配列番号23である。

【0627】

(20-2)で合成したAc-RGNCA YHKWQ I I WCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号23) (8.20 mg, 3.70  $\mu\text{mol}$ 、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.30 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(60.0 mg, 148  $\mu\text{mol}$ )をアセトニトリル(0.30 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(2.2 mg, 0.88  $\mu\text{mol}$ )を得た。

【0628】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  836.80  $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$

HPLC純度: 93%

【0629】

(20-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(20-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラス

10

20

30

40

50

ツズマブ（中外製薬）500  $\mu\text{g}$  を60 mM酢酸ナトリウムバッファー（pH 4.7）46.9  $\mu\text{L}$  に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$ （抗体に対して30等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153121にピークが確認された。

【0630】

（20-5）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（20-4）で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$ （抗体に対して等量）を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0631】

（20-6）抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

（20-5）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column（Waters）4.6  $\times$  100 mm 2.5  $\mu\text{m}$ を使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.0, B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min（データ採取20 min）、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0632】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0633】

Retention Time 14.8203分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる（図28）。

【0634】

（20-7）トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の（3-1）記載の方法により、（20-4）で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0635】

[実施例21: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

（21-1）IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YH K H Q I I W C T Y H - NH<sub>2</sub>（配列番号24）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（68.7 mg, 31.6  $\mu\text{mol}$ ）を得た。

【0636】

MS (ESI) m/z: z = 3 724.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 543.85 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0637】

（21-2）Ac-RGNCA YH K H Q I I W C T Y H - NH<sub>2</sub>（配列番号24）4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

10

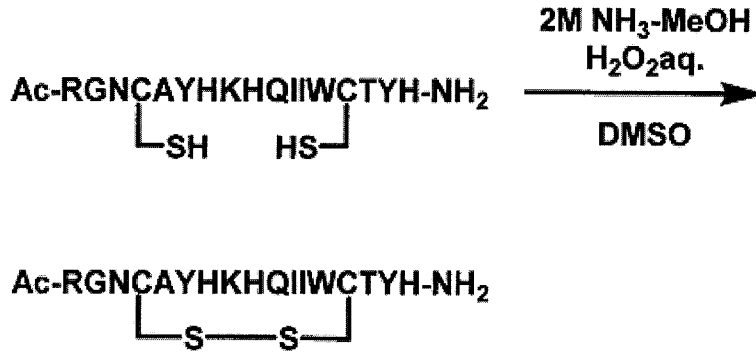
20

30

40

50

【化 8 4】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 24 である。

【0638】

(21-1) で合成したペプチド (68.7 mg, 31.6  $\mu\text{mol}$ ) を DMSO に溶解し 100 mM とした後、2 M  $\text{NH}_3\text{-MeOH}$  を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (44.9 mg, 20.7  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

20

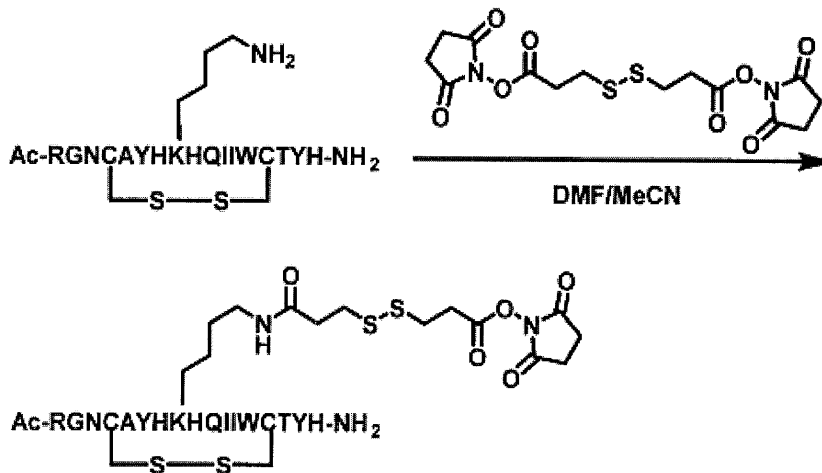
【0639】

MS (ESI)  $m/z$  :  $z = 4$  543.55  $[M + 4H]^4+$

【0640】

(21-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 8 5】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号 24 である。

【0641】

(21-2) で合成した  $\text{Ac-RGNCA YHKKHQI IWCTYH-NH}_2$  (配列番号 24) (44.9 mg, 20.7  $\mu\text{mol}$ 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (60.0 mg, 148  $\mu\text{mol}$ ) をアセトニトリル (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を

50

0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(3.30mg, 1.34 $\mu$ mol)を得た。

【0642】

MS(ESI) m/z: z = 4 615.55 [M + 3H]<sup>4+</sup>

HPLC純度: 68%

【0643】

(21-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(21-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152909にピークが確認された。

【0644】

(21-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(21-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50684、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0645】

(21-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(21-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【0646】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0647】

Retention Time 12.5579分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図29)。

【0648】

(21-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(21-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E\_UnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0649】

[実施例22: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペ

10

20

30

40

50

プチジスルフィドリinker連結物 - N H S 活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

( 2 2 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K T Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 5 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 4 6 . 5 m g , 2 1 . 8 μ m o l ) を得た。

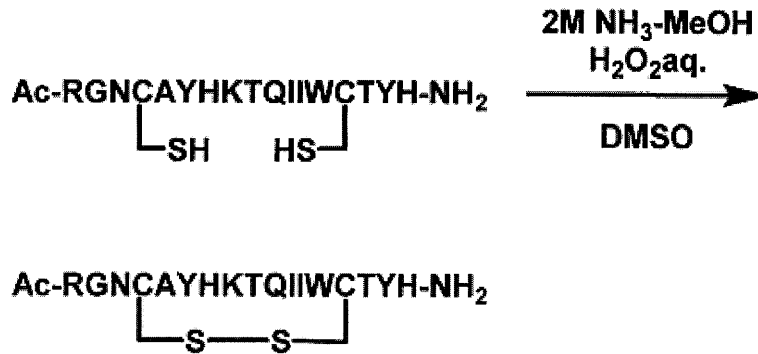
【 0 6 5 0 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 1 2 . 8 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup> , z = 4 5 3 4 . 8 5 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

【 0 6 5 1 】

( 2 2 - 2 ) A c - R G N C A Y H K T Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 2 5 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 8 6 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 2 5 である。

【 0 6 5 2 】

( 2 2 - 1 ) で合成したペプチド ( 4 6 . 5 m g , 2 1 . 8 μ m o l ) を D M S O に溶解し 1 0 0 m M とした後、 2 M N H <sub>3</sub> - M e O H を 2 等量、過酸化水素水を 1 等量加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 3 1 . 6 m g , 1 4 . 8 μ m o l ) を得た。

【 0 6 5 3 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 1 1 . 9 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup> , z = 4 5 3 4 . 3 0 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

【 0 6 5 4 】

( 2 2 - 3 ) ジスルフィドリinkerとペプチドの連結

10

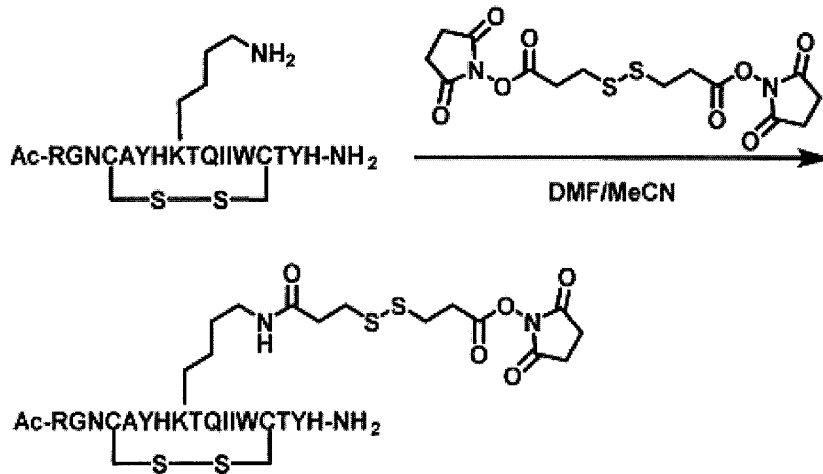
20

30

40

50

## 【化 8 7】



上記アミノ酸配列は、配列番号 25 である。

## 【0655】

(22-2) で合成した Ac-RGNCAYHKTQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 25) (31.6 mg, 14.8 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (120 mg, 296 μmol) をアセトニトリル (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.50 mg, 2.27 μmol) を得た。

## 【0656】

MS (ESI) m/z : z = 3 808.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 89%

## 【0657】

(22-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(22-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152837 にピークが確認された。

## 【0658】

(22-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(19-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50686、50844 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピークが観測された。

10

20

30

40

50

## 【0659】

(22-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(22-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

## 【0660】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

- a: トラスツズマブ原料  
b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

## 【0661】

Retention Time 12.5231分はペプチドが2個導入された化合物で  
あると考えられる(図30)。

## 【0662】

(22-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(22-4)で得られた抗体・ペプチド複  
合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E NumberingにおけるLys246お  
よびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能  
である。

## 【0663】

[実施例23: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペ  
プチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用  
いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(23-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKLQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号26)のペプチドを実  
施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(32.2mg, 15.0 μ  
mol)を得た。

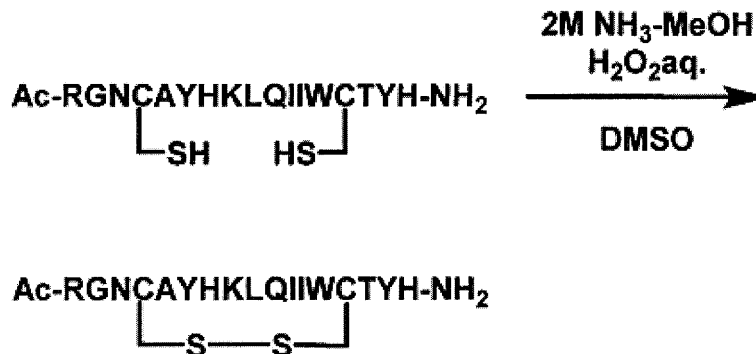
## 【0664】

MS (ESI) m/z: z = 3 716.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 537.85  
[M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0665】

(23-2) Ac-RGNCA YHKLQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号26) 4位  
と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化88】



上記アミノ酸配列は、配列番号26である。

## 【0666】

(23-1)で合成したペプチド(32.2mg, 15.0 μmol)をDMSOに溶

解し 100 mMとした後、2 M NH<sub>3</sub> - MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(9.40 mg, 4.38 μmol)を得た。

【0667】

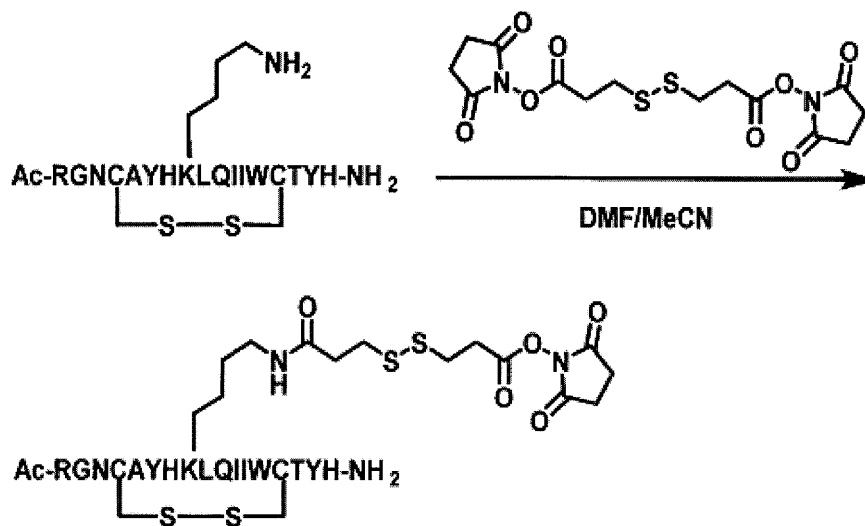
MS (ESI) m/z : z = 3 716.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 537.35 [M + 4H]<sup>4+</sup>

10

【0668】

(23-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化89】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号26である。

30

【0669】

(23-2) で合成した Ac-RGNCAYHKLQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号26) (9.40 mg, 4.38 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (70.7 mg, 175 μmol) をアセトニトリル(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(2.80 mg, 1.15 μmol)を得た。

40

【0670】

MS (ESI) m/z : z = 3 812.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 80%

【0671】

(23-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(23-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,

50



N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153053にピークが確認された。

【0672】

(23-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(23-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0673】

(23-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(23-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0674】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0675】

Retention Time 13.5717分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図31)。

【0676】

(23-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(23-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0677】

[実施例24:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(24-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-CAYHKLQIVWC-NH<sub>2</sub>(配列番号27)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(65.3 mg, 48.4 µmol)を得た。

【0678】

MS(ESI) m/z: z = 2 675.20 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【0679】

(24-2)Ac-CAYHKLQIVWC-NH<sub>2</sub>(配列番号27)1位と11位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

10

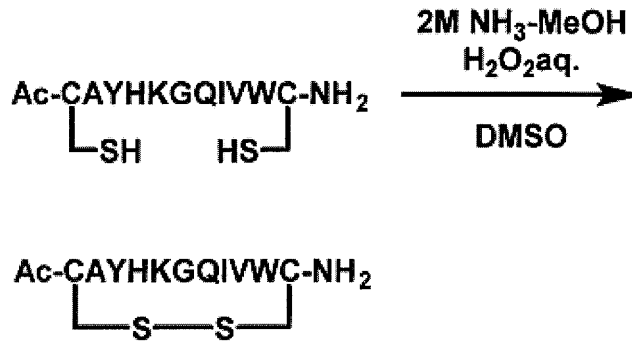
20

30

40

50

【化90】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号27である。

【0680】

(24-1)で合成したペプチド(65.3mg, 48.4 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(36.8mg, 27.3 μmol)を得た。

20

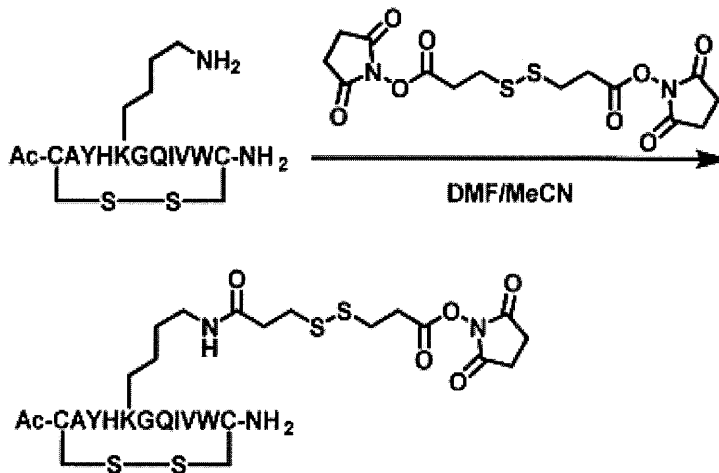
【0681】

MS (ESI) m/z : z = 2 674.35 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【0682】

(24-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化91】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号27である。

【0683】

(24-2)で合成したAc-CAYHKLQIVWC-NH<sub>2</sub>(配列番号27)(36.8mg, 27.3 μmol、ただし1番目と11番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(442mg, 1.09mmol)をアセトニトリル(0.40mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含

50

有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(24.5mg, 15.0 μmol)を得た。

【0684】

MS(ESI) m/z : z = 2 818.85 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC純度 : 85%

【0685】

(24-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

10

(24-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が149590にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151270にピークが確認された。

【0686】

(24-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

20

(24-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0687】

(24-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(24-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer : 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B\_\_Buffer : 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

30

【0688】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

40

【0689】

Retention Time 11.5053分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.9410分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図32)。

【0690】

(24-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(24-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

50

## 【0691】

[実施例25：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(25-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-CAYHKLQLIWC-NH<sub>2</sub>（配列番号28）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（54.3mg, 39.8μmol）を得た。

## 【0692】

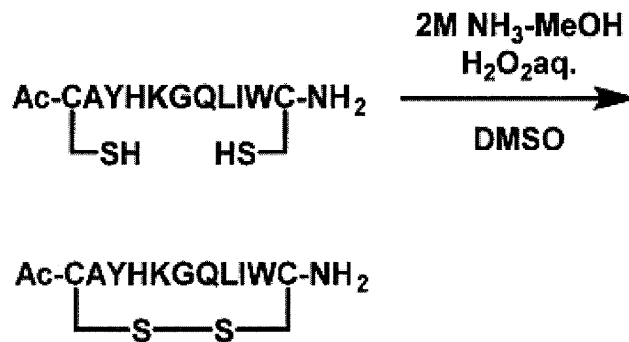
MS (ESI) m/z : z = 2 682.25 [M + 2H]<sup>2+</sup>

10

## 【0693】

(25-2) Ac-CAYHKLQLIWC-NH<sub>2</sub>（配列番号28）1位と11位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化92】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号28である。

## 【0694】

(25-1)で合成したペプチド（54.3mg, 39.8μmol）をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（34.6mg, 25.4μmol）を得た。

30

## 【0695】

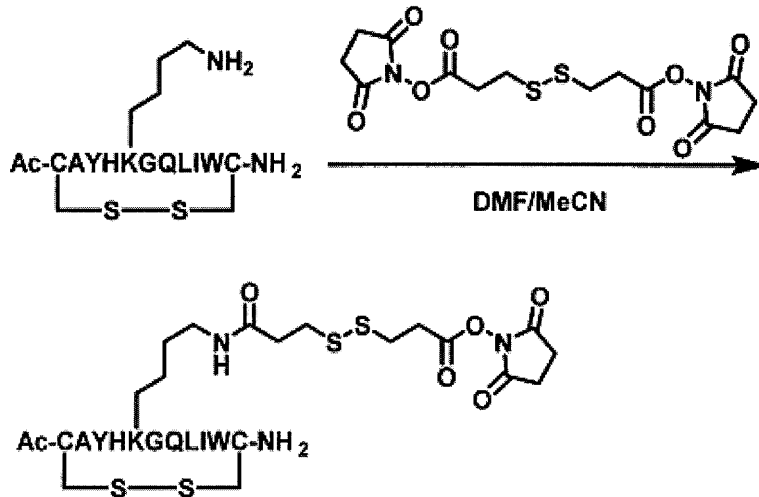
MS (ESI) m/z : z = 2 681.20 [M + 2H]<sup>2+</sup>

## 【0696】

(25-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

40

## 【化 9 3】



上記アミノ酸配列は、配列番号 28 である。

## 【0697】

(25-2) で合成した Ac-CAYHKLQLIWC-NH<sub>2</sub> (配列番号 28) (3.46 mg, 25.4 μmol、ただし 1 番目と 11 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (411 mg, 1.02 mmol) をアセトニトリル (0.40 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (22.0 mg, 13.3 μmol) を得た。

## 【0698】

MS (ESI) m/z : z = 2 835.85 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC 純度 : 88%

## 【0699】

(25-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(25-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 149756 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 151131 にピークが確認された。

## 【0700】

(25-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(25-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

10

20

30

40

50

オニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0701】

(25-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(25-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0702】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0703】

Retention Time 11.4271分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.7939分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図33)。

【0704】

(25-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(25-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E NumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【0705】

[実施例26: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(26-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-CAYHKSQIVWC-NH<sub>2</sub> (配列番号29)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(53.3 mg, 38.7 μmol)を得た。

30

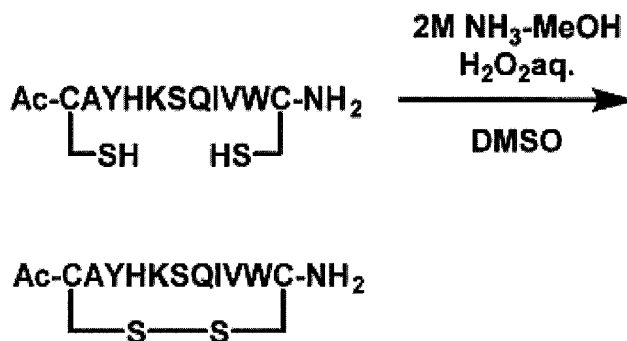
【0706】

MS (ESI) m/z: z = 2 690.05 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【0707】

(26-2) Ac-CAYHKSQIVWC-NH<sub>2</sub> (配列番号29) 1位と11位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化94】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号29である。

50

## 【0708】

(26-1)で合成したペプチド(53.3 mg, 38.7  $\mu\text{mol}$ )をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M  $\text{NH}_3$ -MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(22.8 mg, 16.6  $\mu\text{mol}$ )を得た。

10

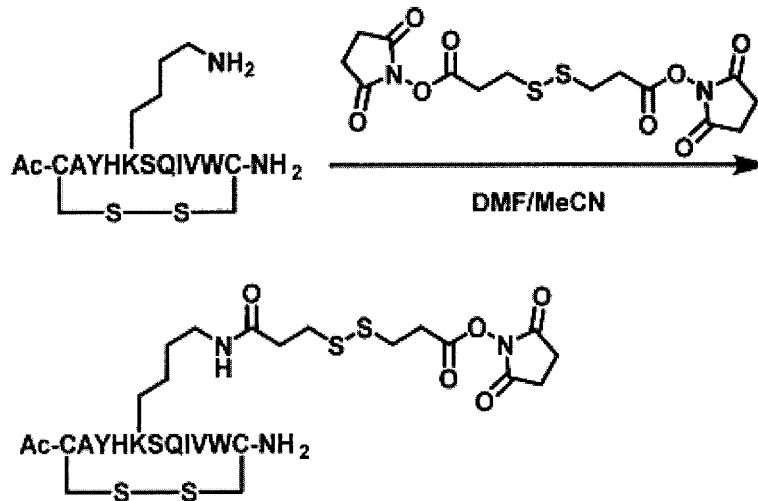
## 【0709】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 2$  689.20  $[M + 2H]^2+$

## 【0710】

(26-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化95】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号29である。

30

## 【0711】

(26-2)で合成したAc-CAYHKSQIVWC-NH<sub>2</sub>(配列番号29)(22.8 mg, 16.6  $\mu\text{mol}$ 、ただし1番目と11番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(134 mg, 332  $\mu\text{mol}$ )をアセトニトリル(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(8.50 mg, 5.10  $\mu\text{mol}$ )を得た。

40

## 【0712】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 2$  833.75  $[M + 2H]^2+$

HPLC純度: 92%

## 【0713】

(26-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(26-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,

50

N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、合性ペプチドが一つ導入された生成物が149772にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151323にピークが確認された。

【0714】

(26-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(26-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0715】

(26-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(26-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A\_Buffer:0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer:0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0716】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0717】

Retention Time 11.8301分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、13.2565分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図34)。

【0718】

(26-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(26-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0719】

[実施例27:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(27-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q L V F C T Y H-NH<sub>2</sub>(配列番号30)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(168 mg, 82.4 µmol)を得た。

【0720】

MS(ESI) m/z: z = 3 680.30 [M+3H]<sup>3+</sup>, z = 4 510.55 [M+4H]<sup>4+</sup>

10

20

30

40

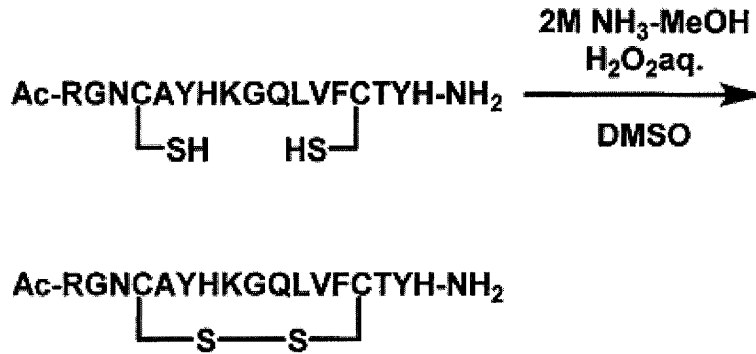
50



【0721】

(27-2) Ac-RGNCA YHKGQLVFCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号30) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化96】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号30である。

【0722】

(27-1)で合成したペプチド(168mg, 82.4 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(22.1mg, 10.9 μmol)を得た。

20

【0723】

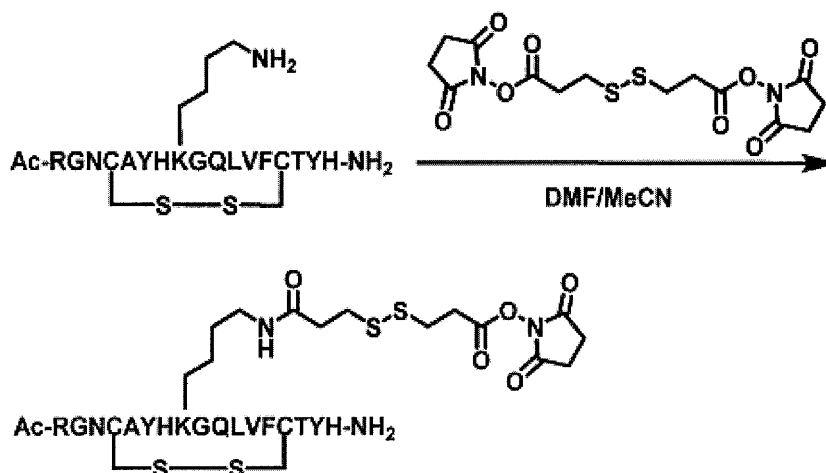
MS (ESI) m/z : z = 3 679.55 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 510.10 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0724】

(27-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

30

【化97】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号30である。

【0725】

(27-2)で合成したAc-RGNCA YHKGQLVFCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号30) (22.1mg, 10.9 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジ

50

ル) (176 mg, 436  $\mu\text{mol}$ ) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 (8.00 mg, 3.34  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

【0726】

MS (ESI) m/z : z = 3 776.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

10

HPLC純度 : 89%

【0727】

(27-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(27-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500  $\mu\text{g}$  を60 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9  $\mu\text{L}$  に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$  (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148069にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150279にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152490にピークが確認された。

20

【0728】

(27-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(27-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$  (抗体に対して等量) を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0729】

(27-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(27-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5  $\mu\text{m}$  を使用した。A\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【0730】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

【0731】

Retention Time 9.6408分はトラスツズマブ原料、10.3664分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.9759分はペプチドがトラスツズマブに2個であると考えられる (図35)。

【0732】

50

(27-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化  
 実施例3の(3-1)記載の方法により、(27-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0733】

[実施例28：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(28-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q Q V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号31)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(51.3mg, 24.5 μmol)を得た。

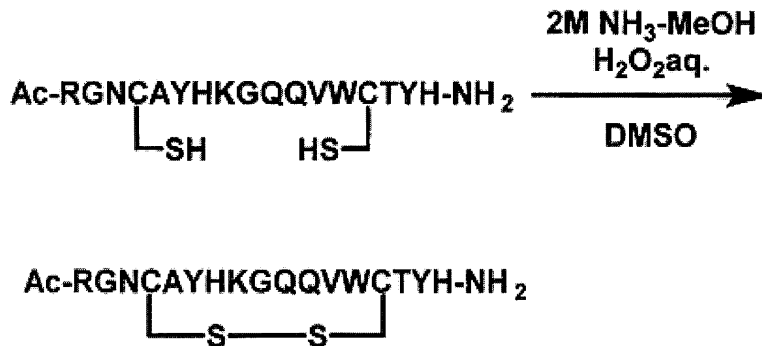
【0734】

MS (ESI) m/z : z = 3 689.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 524.05 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0735】

(28-2) Ac-RGNCA Y H K G Q Q V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号31) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化98】



上記アミノ酸配列は、配列番号31である。

【0736】

(28-1)で合成したペプチド(51.3mg, 24.5 μmol)をDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(31.6mg, 15.1 μmol)を得た。

【0737】

MS (ESI) m/z : z = 3 697.60 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 523.60 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0738】

(28-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

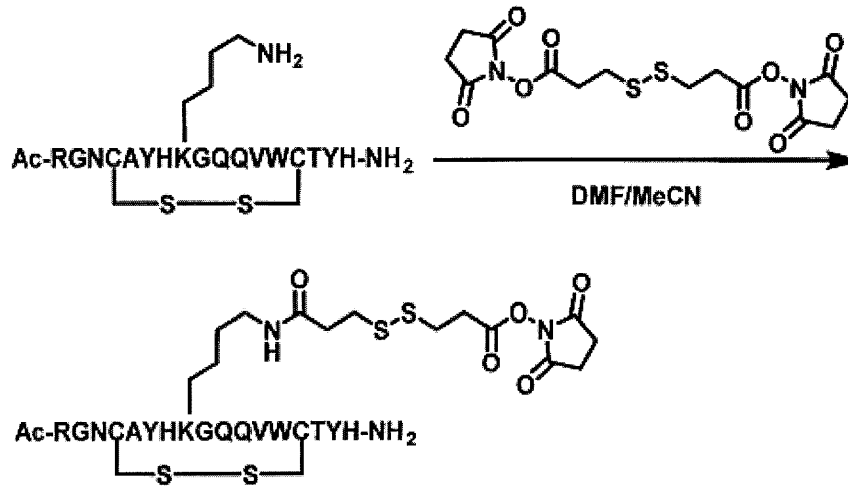
20

30

40

50

【化 9 9】



上記アミノ酸配列は、配列番号 31 である。

【0739】

(28-2) で合成した Ac-RGNCA<sup>Y</sup>HKGGQ<sup>Q</sup>VWCT<sup>Y</sup>H-NH<sub>2</sub> (配列番号 31) (31.6 mg, 15.1 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (244 mg, 604 μmol) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (6.00 mg, 2.52 μmol) を得た。

【0740】

MS (ESI) m/z : z = 3 794.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 91%

【0741】

(28-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(28-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148057 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150484 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152587 にピークが確認された。

【0742】

(28-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(28-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、5

10

20

30

40

50

0756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0743】

(28-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(28-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0744】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0745】

Retention Time 9.8954分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.1116分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図36)。

20

【0746】

(28-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(28-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0747】

[実施例29: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

30

(29-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G Q E V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号32)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(54.0 mg, 25.8 μmol)を得た。

【0748】

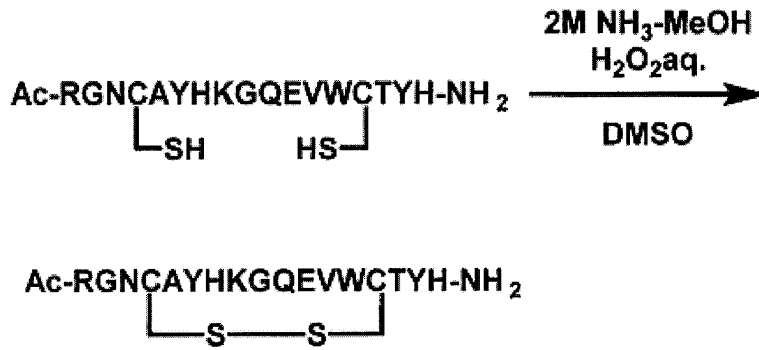
MS (ESI) m/z: z = 3 698.80 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 524.40 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0749】

(29-2) Ac-RGNCA Y H K G Q E V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号32) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

40

【化100】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号32である。

【0750】

(29-1)で合成したペプチド(54.0 mg, 25.8 μmol)をDMSOに溶解し100 mMとした後、2 M NH<sub>3</sub>-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(22.2 mg, 10.6 μmol)を得た。

20

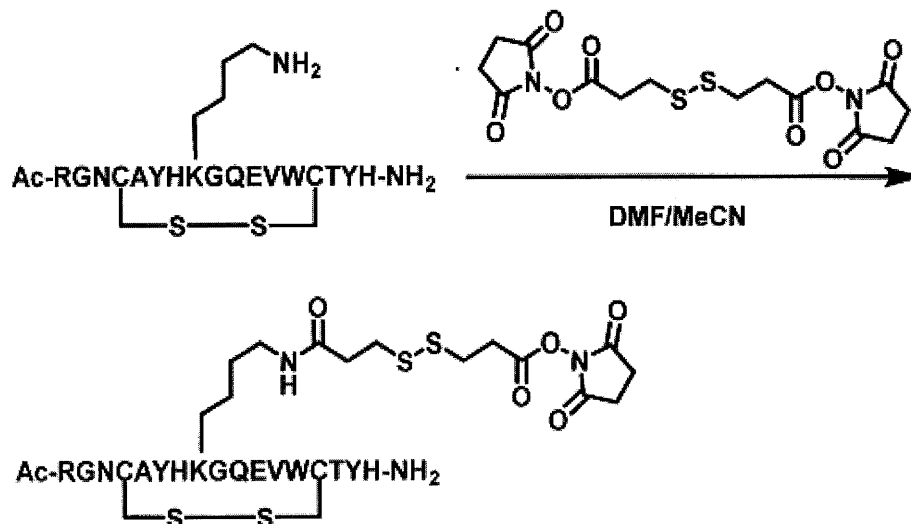
【0751】

MS (ESI) m/z : z = 3 698.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 523.85 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0752】

(29-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化101】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号32である。

【0753】

(29-2)で合成したAc-RGNCAYHKGQEVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号32)(22.2 mg, 10.6 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(171 mg, 424 μmol)をアセトニトリル(0.50 mL)に溶解した溶液

50

を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(4.50mg, 1.89 $\mu$ mol)を得た。

【0754】

MS (ESI) m/z : z = 3 794.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 92%

10

【0755】

(29-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(29-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150036にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152599にピークが確認された。

20

【0756】

(29-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(29-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0757】

(29-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(29-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【0758】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0759】

Retention Time 9.8060分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.1940分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図37)。

【0760】

(29-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(29-4)で得られた抗体・ペプチド複合

50

体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0761】

[実施例30：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(30-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-CAYHKGQLVWC-NH<sub>2</sub>（配列番号33）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（171mg, 118 μmol）を得た。

10

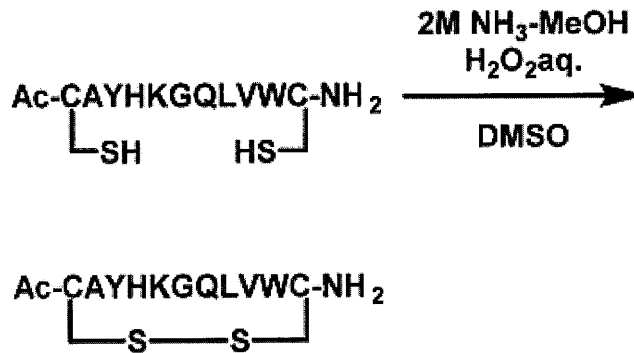
【0762】

MS (ESI) m/z : z = 2 675.20 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【0763】

(30-2) Ac-CAYHKGQLVWC-NH<sub>2</sub>（配列番号33）4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化102】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号33である。

【0764】

(30-1)で合成したペプチド（171mg, 118 μmol）をDMSO（5.0 mL）に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH（118 μL, 236 mmol）、過酸化水素水（241 μL, 2.36 mmol）を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（23.2mg, 17.2 μmol）を得た。

30

【0765】

MS (ESI) m/z : z = 1 1347.8 [M + H]<sup>+</sup>, z = 2 674.15 [M + 2H]<sup>2+</sup>

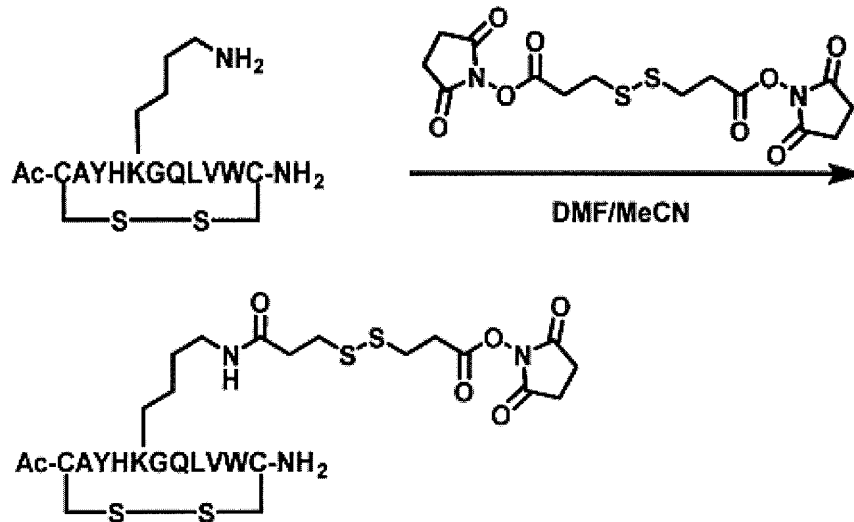
40

【0766】

(30-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結



【化 1 0 3】



上記アミノ酸配列は、配列番号 33 である。

【0767】

(30-2) で合成した Ac-CAYHKGQLVWC-NH<sub>2</sub> (配列番号 33) 23.2 mg, 17.2 μmol、ただし 1 番目と 11 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.50 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (278 mg, 688 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (9.00 mg, 5.50 μmol) を得た。

【0768】

MS (ESI) m/z : z = 2 818.65 [M + 2H]<sup>2+</sup>  
HPLC 純度 : 92%

【0769】

(30-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(30-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 149591 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 151112 にピークが確認された。

【0770】

(30-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(30-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、5

10

20

30

40

50

0756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0771】

(30-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(30-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH4)2SO4, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

10

【0772】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0773】

Retention Time 11.7171分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、13.0646分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図38)。

20

【0774】

(30-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(30-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0775】

[実施例31: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

30

(31-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKAQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号34)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(58.8mg, 28.1μmol)を得た。

【0776】

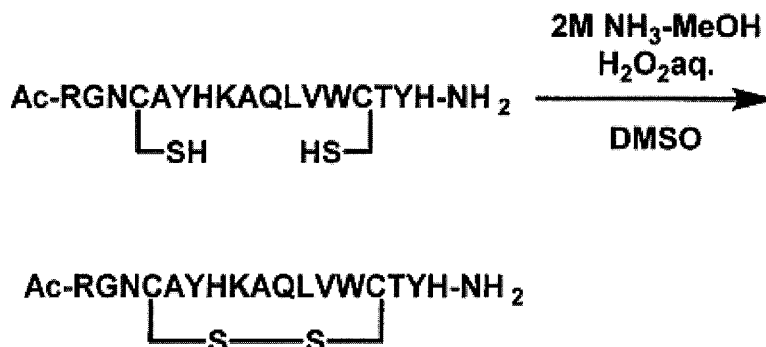
MS (ESI) m/z: z = 3 697.90 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【0777】

(31-2) Ac-RGNCA YHKAQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号34) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化104】

40



50

上記アミノ酸配列は、配列番号34である。

【0778】

(31-1)で合成したペプチド(58.8mg, 28.1 $\mu$ mol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(28.1 $\mu$ L, 56.2 $\mu$ mol)、過酸化水素水(57.4 $\mu$ L, 562 $\mu$ mol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(21.2mg, 10.1 $\mu$ mol)を得た。

10

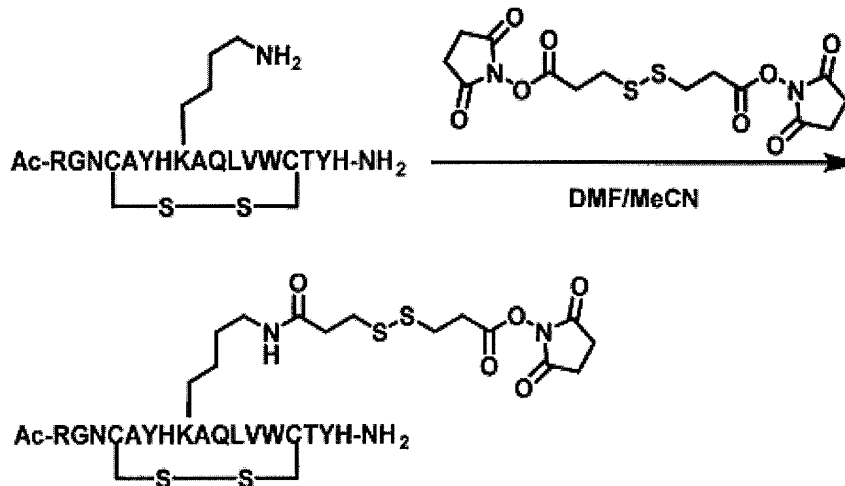
【0779】

MS(ESI)m/z: z = 3 697.50 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【0780】

(31-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化105】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号34である。

【0781】

(31-2)で合成したAc-RGNCAYHKAQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号34)(21.2mg, 10.1 $\mu$ mol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(163mg, 404 $\mu$ mol)をアセトニトリル(1.50mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(8.00mg, 3.36 $\mu$ mol)を得た。

40

【0782】

MS(ESI)m/z: z = 3 794.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 91%

【0783】

(31-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

50

(31-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148057にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150492にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152755にピークが確認された。

【0784】

(31-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(31-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0785】

(31-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(31-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【0786】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0787】

Retention Time 10.5613分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.2219分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図39)。

【0788】

(31-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(31-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0789】

[実施例32:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(32-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K V Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub>(配列番号35)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(52.2mg, 24.6 $\mu$ mol)を得た。

【0790】

10

20

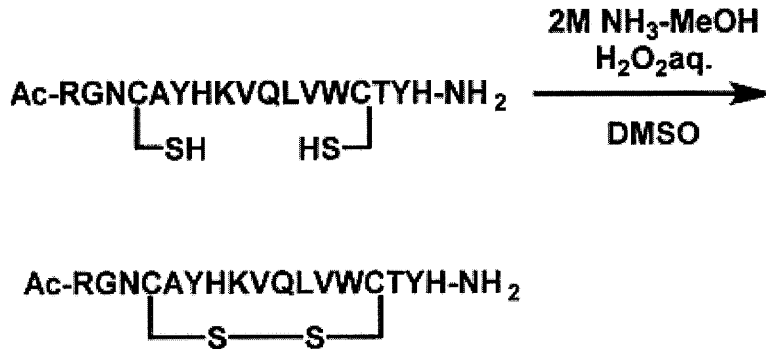
30

40

50

MS (ESI)  $m/z$  :  $z = 4$  530.60 [M + 4H]<sup>4+</sup>  
【0791】

(32-2) Ac-RGNCA<sup>Y</sup>HKVQLVWCT<sup>Y</sup>H-NH<sub>2</sub> (配列番号35) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成  
【化106】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号35である。

【0792】

(32-1) で合成したペプチド (52.2 mg, 24.6 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (24.6 μL, 49.2 μmol)、過酸化水素水 (50.2 μL, 492 μmol) を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (17.3 mg, 8.17 μmol) を得た。

20

【0793】

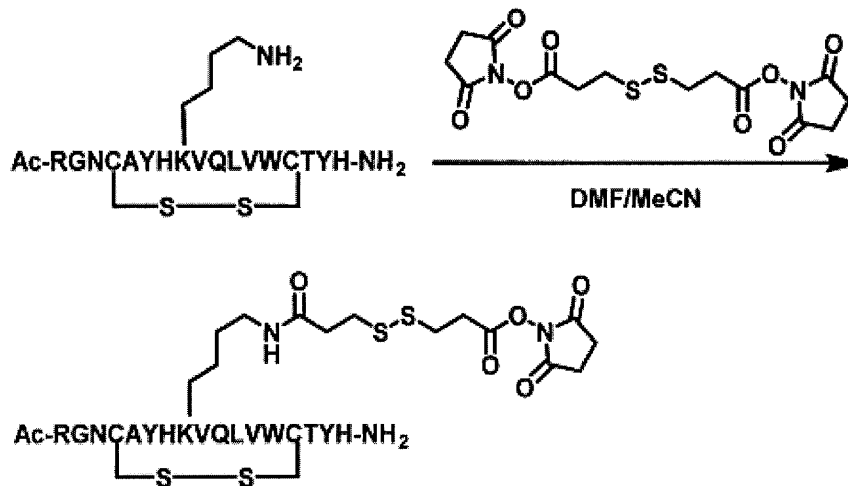
MS (ESI)  $m/z$  :  $z = 4$  530.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0794】

(32-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

30

【化107】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号35である。

【0795】

(32-2) で合成した Ac-RGNCA<sup>Y</sup>HKVQLVWCT<sup>Y</sup>H-NH<sub>2</sub> (配列番号35) (17.3 mg, 8.17 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムア

50

ミド ( 1 . 0 0 m L ) に溶解し、3, 3' - ジチオジプロピオン酸ジ ( N - スクシンイミジル ) ( 1 3 2 m g , 3 2 7 μ m o l ) をアセトニトリル ( 1 . 0 0 m L ) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ( 6 . 8 0 m g , 2 . 8 3 μ m o l ) を得た。

【0796】

MS (ESI) m/z : z = 3 803.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>  
HPLC 純度 : 82%

【0797】

(32-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(32-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体はN, N' - ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を60mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148057にピークが観測され、原料のトラスツズマブは148062にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150517にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152998にピークが確認された。

【0798】

(32-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(32-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0799】

(32-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(32-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 × 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer : 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer : 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【0800】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 30 等量 ;

【0801】

Retention Time 9.8551分はトラスツズマブ原料、11.0564分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.9854分はペプチドが

10

20

30

40

50

2個導入された化合物であると考えられる(図40)。

【0802】

(32-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(32-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0803】

[実施例33: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(33-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K L Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号36)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(155 mg, 72.7 μmol)を得た。

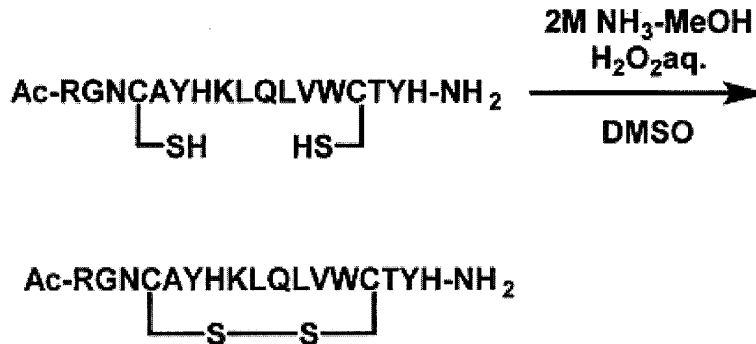
【0804】

MS (ESI) m/z : z = 3 7 1 2 . 4 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【0805】

(33-2) Ac-RGNCA Y H K L Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号36) 4位と14位のC y sでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化108】



上記アミノ酸配列は、配列番号36である。

【0806】

(33-1)で合成したペプチド(155 mg, 72.7 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H (72.7 μL, 145 μmol)、過酸化水素水(148 μL, 1.45 mmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(13.3 mg, 6.24 μmol)を得た。

【0807】

MS (ESI) m/z : z = 3 7 1 1 . 5 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【0808】

(33-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

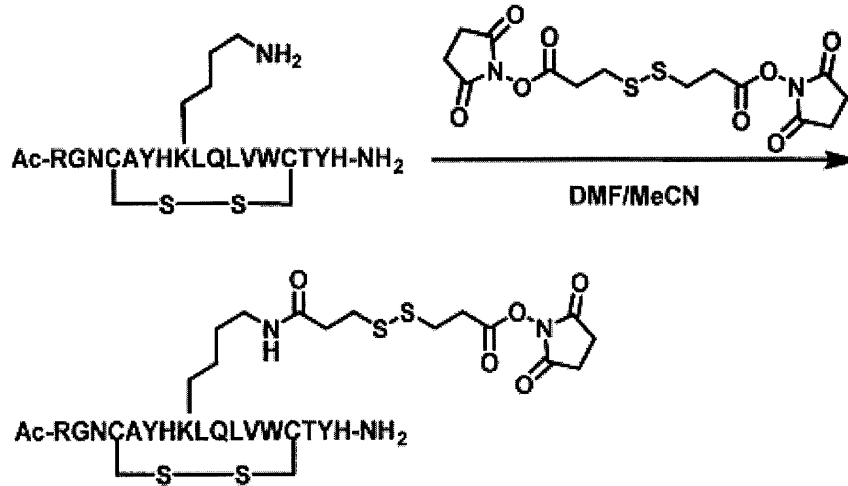
20

30

40

50

【化109】



上記アミノ酸配列は、配列番号36である。

【0809】

(33-2)で合成したAc-RGNCAYHKLQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号36)(13.3mg, 6.24μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(101mg, 250μmol)をアセトニトリル(1.00mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(7.00mg, 2.89μmol)を得た。

【0810】

MS(ESI)m/z: z = 3 807.80 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 89%

【0811】

(33-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(33-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148057にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150899にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153025にピークが確認された。

【0812】

(33-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(33-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、5

10

20

30

40

50



0756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0813】

(33-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(33-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0814】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0815】

Retention Time 11.2079分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.2377分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図41)。

20

【0816】

(33-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(33-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0817】

[実施例34: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

30

(34-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K I Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号37)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(153 mg, 71.7 μmol)を得た。

【0818】

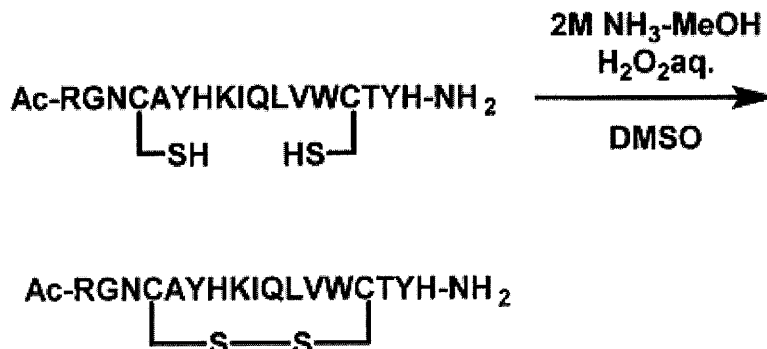
MS (ESI) m/z: z = 3 712.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【0819】

(34-2) Ac-RGNCA Y H K I Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号37) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化110】

40



50

上記アミノ酸配列は、配列番号 37 である。

【0820】

(34-1) で合成したペプチド (153 mg, 71.7 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (71.7 μL, 143 μmol)、過酸化水素水 (146 μL, 1.43 mmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (15.7 mg, 7.37 μmol) を得た。

10

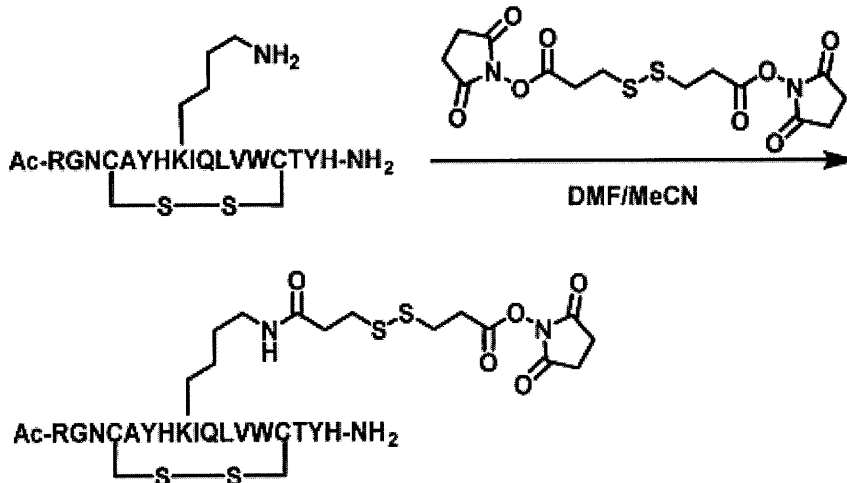
【0821】

MS (ESI) m/z : z = 3 711.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【0822】

(34-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化111】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 37 である。

【0823】

(34-2) で合成した Ac-RGNCAYHKKIQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 37) (15.7 mg, 7.37 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (119 mg, 295 μmol) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.00 mg, 2.07 μmol) を得た。

40

【0824】

MS (ESI) m/z : z = 3 807.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 94%

【0825】

(34-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

50

(34-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150720にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153210にピークが確認された。

【0826】

(34-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(34-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0827】

(34-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(34-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

20

【0828】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

30

【0829】

Retention Time 9.8355分はトラスツズマブ原料、11.2645分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.4388分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図42)。

【0830】

(34-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(34-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

40

【0831】

[実施例35: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(35-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K S Q L V W C T Y H-NH<sub>2</sub>(配列番号38)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(167 mg, 79.2 µmol)を得た。

【0832】

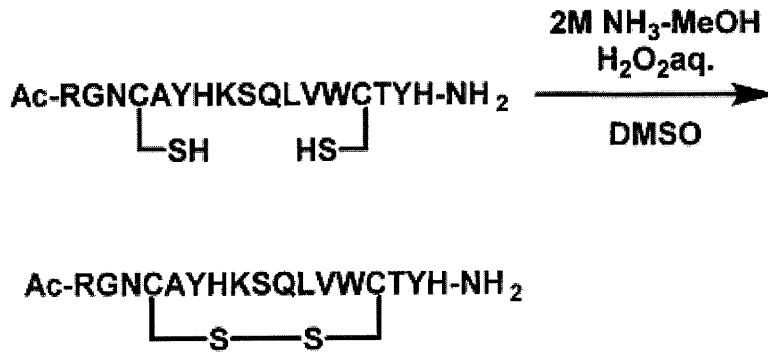
MS(ESI) m/z: z = 3 703.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>

50

【0833】

(35-2) Ac-RGNCA YHKS QLVWCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号38) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化112】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号38である。

【0834】

(35-1)で合成したペプチド(167mg, 79.2 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(79.2 μL, 158 μmol)、過酸化水素水(161 μL, 1.58 mmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(19.6 mg, 9.31 μmol)を得た。

20

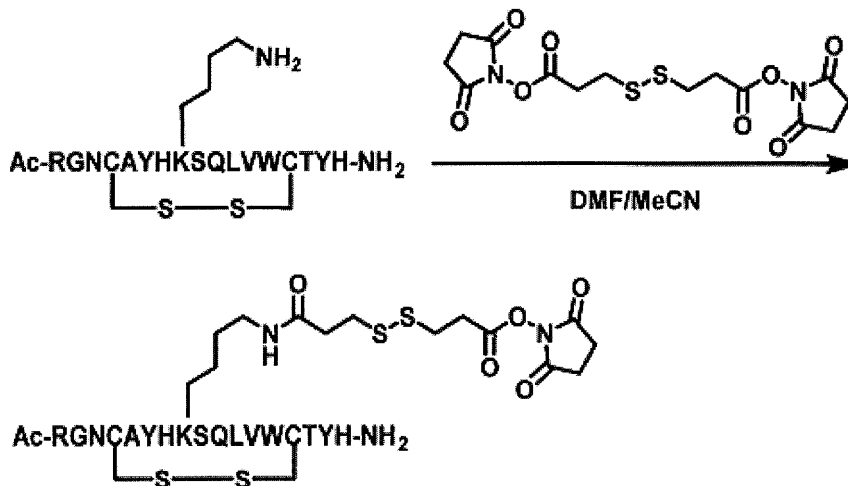
【0835】

MS(E SI) m/z: z = 3 702.90 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【0836】

(35-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化113】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号38である。

【0837】

(35-2)で合成したAc-RGNCA YHKS QLVWCT YH-NH<sub>2</sub> (配列番号38)(19.6 mg, 9.31 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジ

50

ル) (150 mg, 372  $\mu\text{mol}$ ) をアセトニトリル (1.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 (7.50 mg, 3.13  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

【0838】

MS (ESI) m/z : z = 3 799.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

10

HPLC 純度 : 92%

【0839】

(35-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(35-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500  $\mu\text{g}$  を60 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9  $\mu\text{L}$  に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$  (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150505にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152784にピークが確認された。

20

【0840】

(35-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(35-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$  (抗体に対して等量) を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0841】

(35-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(35-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5  $\mu\text{m}$  を使用した。A\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【0842】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量 ;

【0843】

Retention Time 10.3834分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.9723分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図43)。

【0844】

(35-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

50

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 3 5 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 0 8 4 5 】

[ 実施例 3 6 : 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

( 3 6 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K T Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 9 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 1 6 4 m g , 7 7 . 3 μ m o l ) を得た。

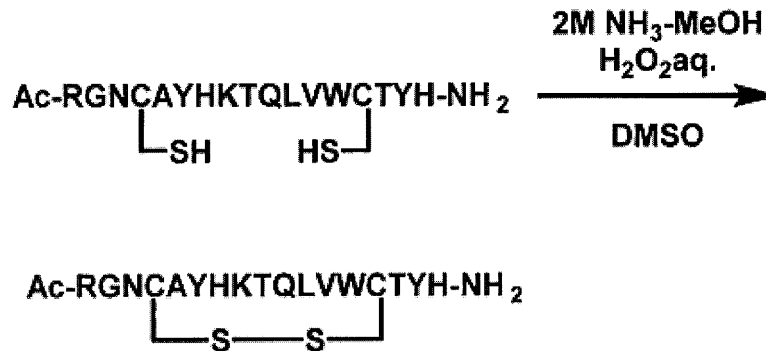
【 0 8 4 6 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 0 8 . 4 0 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

【 0 8 4 7 】

( 3 6 - 2 ) A c - R G N C A Y H K T Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 3 9 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 1 1 4 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 3 9 である。

【 0 8 4 8 】

( 3 6 - 1 ) で合成したペプチド ( 1 6 4 m g , 7 7 . 3 μ m o l ) を D M S O ( 5 . 0 0 m L ) に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H ( 7 7 . 3 μ L , 1 5 5 μ m o l ) 、過酸化水素水 ( 1 5 8 μ L , 1 . 5 5 m m o l ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 1 6 . 3 m g , 7 . 6 9 μ m o l ) を得た。

【 0 8 4 9 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 0 7 . 6 0 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

【 0 8 5 0 】

( 3 6 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

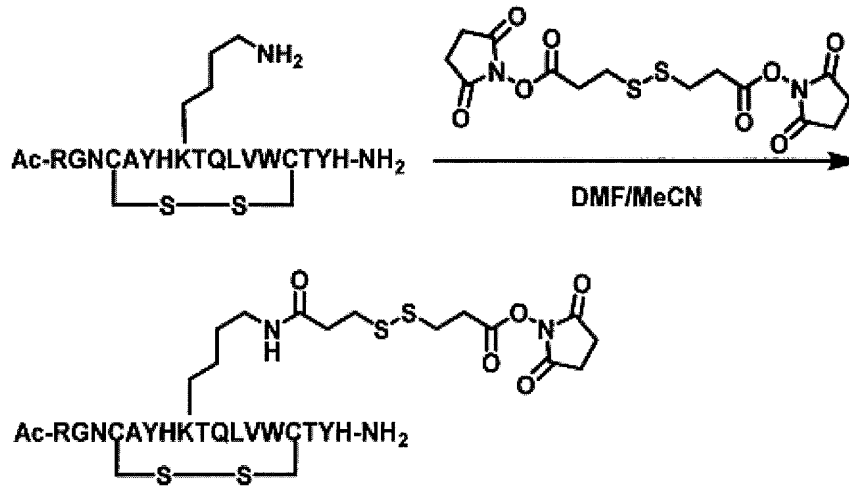
20

30

40

50

【化 1 1 5】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0851】

(36-2) で合成した Ac-RGNCAYHK(TLVWCT)YH-NH<sub>2</sub> (配列番号 39) (16.3 mg, 7.69 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (125 mg, 308 μmol) をアセトニトリル (1.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (4.50 mg, 1.87 μmol) を得た。

20

【0852】

MS (ESI) m/z : z = 3 803.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 89%

30

【0853】

(36-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(36-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152814 にピークが確認された。

40

【0854】

(36-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(36-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50685、50844 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピー

50

クが観測された。

【0855】

(36-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(36-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0856】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0857】

Retention Time 10.5115分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.1143分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図44)。

【0858】

(36-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

20

実施例3の(3-1)記載の方法により、(36-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0859】

[実施例37: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(37-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKNQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号40)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(51.4 mg, 24.1 μmol)を得た。

30

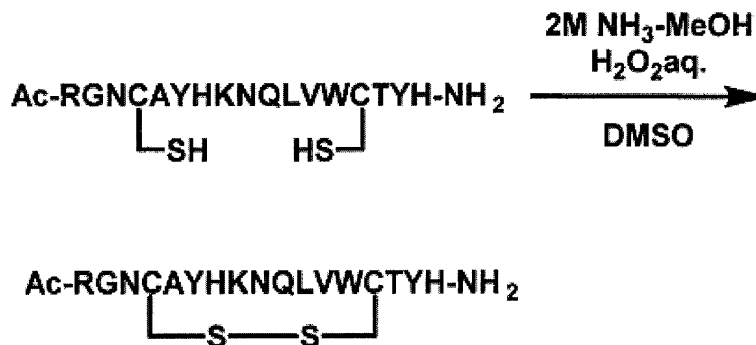
【0860】

MS (ESI) m/z: z = 3 712.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 534.65 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0861】

(37-2) Ac-RGNCA YHKNQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号40) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化116】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号40である。

50



## 【0862】

(37-1)で合成したペプチド(51.4 mg, 24.1 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH(24.1 μL, 48.2 μmol)、過酸化水素水(49.2 μL, 482 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(20.0 mg, 9.38 μmol)を得た。

10

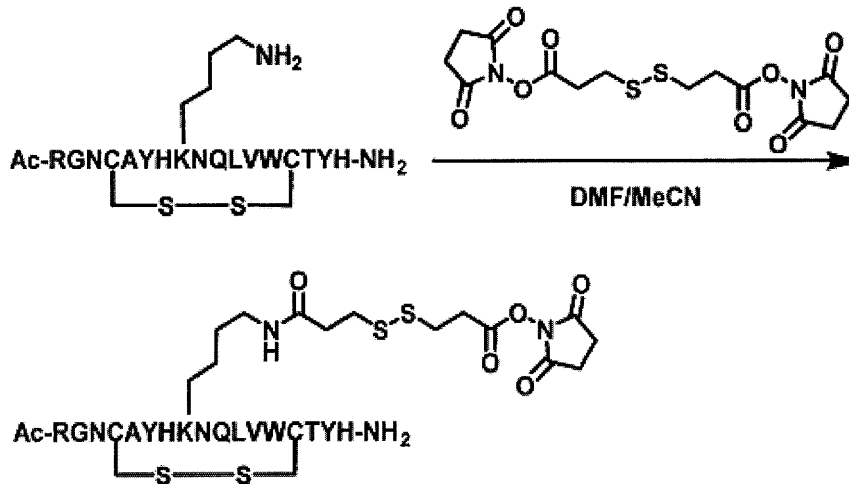
## 【0863】

MS(ESI)m/z: z = 3 711.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 534.10 [M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0864】

(37-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化117】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号40である。

## 【0865】

(37-2)で合成したAc-RGNCAYHKNQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号40)(20.0 mg, 9.38 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(152 mg, 375 μmol)をアセトニトリル(0.50 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(8.7 mg, 3.59 μmol)を得た。

40

## 【0866】

MS(ESI)m/z: z = 3 808.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 93%

## 【0867】

(37-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

50

(37-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150370にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152678にピークが確認された。

【0868】

(37-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(37-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0869】

(37-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(37-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

20

【0870】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

30

【0871】

Retention Time 10.5287分はトラスツズマブ原料、11.0490分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる(図45)。

【0872】

(37-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(37-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0873】

40

[実施例38:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(38-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKDQLVWCT YH-NH<sub>2</sub>(配列番号41)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(50.8mg, 23.7μmol)を得た。

【0874】

MS(ESI)m/z: z=3 712.55[M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 534.75[M+4H]<sup>4+</sup>

50

【0875】

(38-2) Ac-RGNCA YHKDQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号41) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化118】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号41である。

【0876】

(38-1)で合成したペプチド(50.8 mg, 23.7 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(23.8 μL, 47.4 μmol)、過酸化水素水(48.6 μL, 47.4 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(36.8 mg, 17.2 μmol)を得た。

20

【0877】

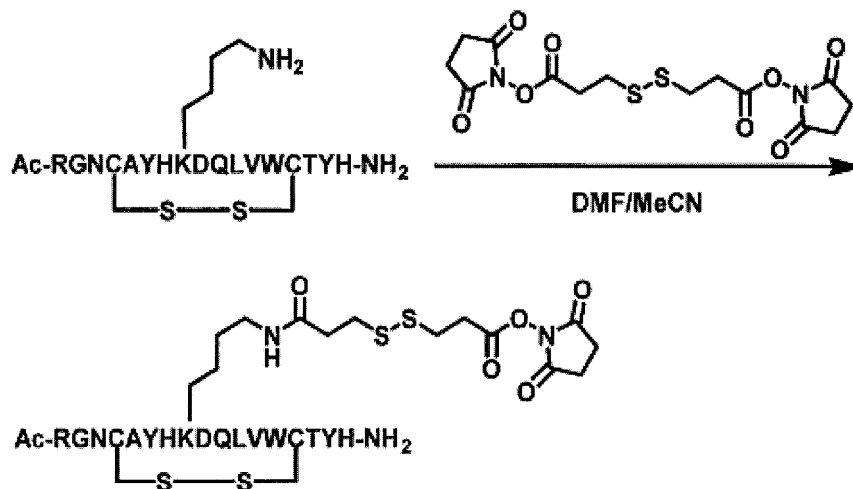
MS(E SI) m/z: z = 3 712.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 534.35 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0878】

(38-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

30

【化119】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号41である。

【0879】

(38-2)で合成したAc-RGNCA YHKDQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号41)(36.8 mg, 17.2 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムア

50

ミド ( 1 . 7 0 m L ) に溶解し、 3 , 3 ' - ジチオジプロピオン酸ジ ( N - スクシンイミジル ) ( 2 7 8 m g , 6 8 8 μ m o l ) をアセトニトリル ( 1 . 0 0 m L ) に溶解した溶液を加え、室温で 2 4 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ( 5 . 8 0 m g , 2 . 3 9 μ m o l ) を得た。

【 0 8 8 0 】

MS ( E S I ) m / z : z = 3 8 0 8 . 4 5 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

H P L C 純度 : 9 1 %

【 0 8 8 1 】

( 3 8 - 4 ) 抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの特異的修飾と E S I - T O F M S による解析

( 3 8 - 3 ) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体は N , N ' - ジメチルホルムアミドに溶解し 2 1 . 6 m M とした。抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブ ( 中外製薬 ) 5 0 0 μ g を 6 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー ( p H 4 . 7 ) 4 6 . 9 μ L に溶解させ、 2 1 . 6 m M のペプチド試薬を 4 . 7 μ L ( 抗体に対して 3 0 等量 ) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を N A P - 5 カラムに添加し、反応を停止させ 2 0 m M P B S バッファーに置換した。結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 1 5 0 3 6 7 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 1 5 2 8 3 1 にピークが確認された。

【 0 8 8 2 】

( 3 8 - 5 ) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での E S I - T O F M S 解析による重鎖選択性の確認

( 3 8 - 4 ) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 m M トリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μ L ( 抗体に対して等量 ) を加えて、室温で 2 0 分攪拌した。E S I - T O F M S により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 5 0 5 9 5 、 5 0 7 5 6 に重鎖ピーク、 2 3 4 4 0 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 5 0 6 8 5 、 5 0 8 4 4 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

【 0 8 8 3 】

( 3 8 - 6 ) 抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの特異的修飾の H I C - U P L C 解析

( 3 8 - 5 ) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を H I C により解析した。カラムは P r o t e i n - P a k H i R e s H I C C o l u m n ( W a t e r s ) 4 . 6 x 1 0 0 m m 2 . 5 μ m を使用した。A \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , 2 . 3 M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> , p H 7 . 0 , B \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , p H 7 . 0 にて流速は 0 . 6 m l / m i n 、グラジエントを A 6 0 % B 4 0 % A 0 % B 1 0 0 % , 1 6 m i n ( データ採取 2 0 m i n ) 、カラム温度は 4 0 、サーモスタット温度は 4 0 、検出器は 2 8 0 n m の波長で検出した。

【 0 8 8 4 】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 3 0 等量 ;

【 0 8 8 5 】

R e t e n s i o n T i m e 1 0 . 1 3 6 5 分はトラスツズマブ原料、 1 0 . 5 1 5 6 分はペプチドがトラスツズマブに 1 個導入された化合物であると考えられる ( 図 4 6 ) 。

【 0 8 8 6 】

( 3 8 - 7 ) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

10

20

30

40

50

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 3 8 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 0 8 8 7 】

[ 実施例 3 9 : 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

( 3 9 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K Q Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 4 2 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 4 2 . 1 m g , 1 9 . 6 μ m o l ) を得た。

10

【 0 8 8 8 】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 1 6 . 9 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup> , z = 4 5 3 8 . 1 0 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

【 0 8 8 9 】

( 3 9 - 2 ) A c - R G N C A Y H K Q Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 4 2 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 1 2 0 】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 4 2 である。

30

【 0 8 9 0 】

( 3 9 - 1 ) で合成したペプチド ( 4 2 . 1 m g , 1 9 . 6 μ m o l ) を D M S O ( 5 . 0 0 m L ) に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H ( 1 9 . 6 μ L , 3 9 . 2 μ m o l ) 、過酸化水素水 ( 4 0 . 0 μ L , 3 9 2 μ m o l ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 1 8 . 1 m g , 8 . 3 9 μ m o l ) を得た。

40

【 0 8 9 1 】

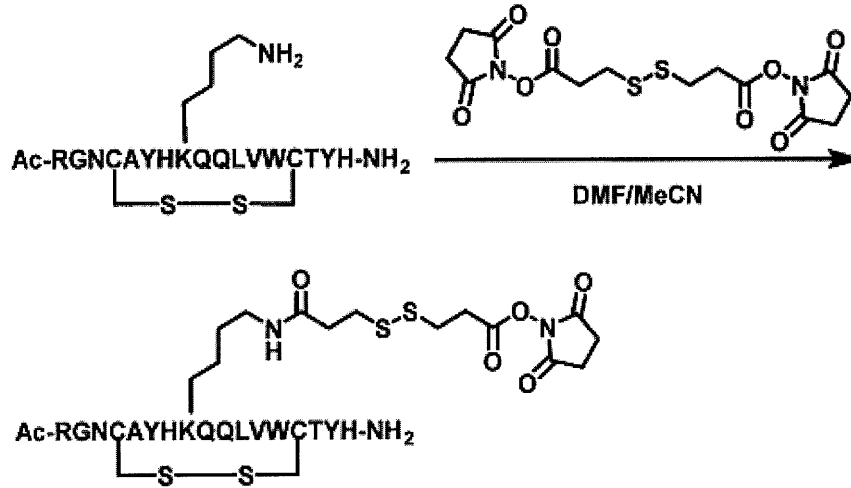
M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 1 6 . 3 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup> , z = 4 5 3 7 . 5 0 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

【 0 8 9 2 】

( 3 9 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

50

【化 1 2 1】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 42 である。

【0893】

(39-2) で合成した Ac-RGNCAYHKQQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 42) (18.1 mg, 8.39 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (34.0 mg, 83.9 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (3.70 mg, 1.52 μmol) を得た。

20

【0894】

MS (ESI) m/z : z = 3 812.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 91%

30

【0895】

(39-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(39-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150540 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152862 にピークが確認された。

40

【0896】

(39-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(39-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

50

オニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0897】

(39-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(39-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0898】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0899】

Retention Time 10.8637分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.3445分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図47)。

【0900】

(39-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(39-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E UnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【0901】

[実施例40: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(40-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKEQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号43)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(38.3 mg, 17.8 μmol)を得た。

30

【0902】

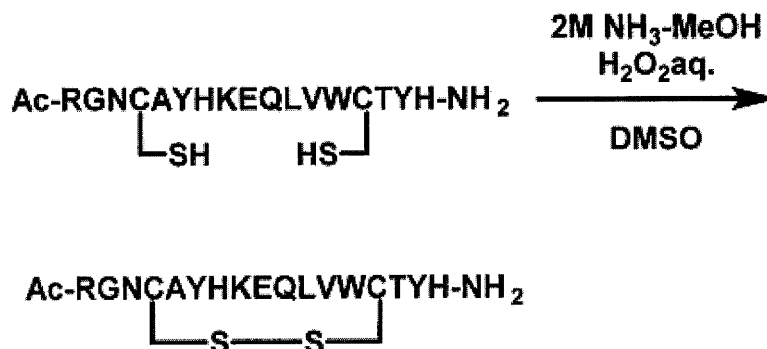
MS (ESI) m/z: z = 3 717.30 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 538.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0903】

(40-2) Ac-RGNCA YHKEQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号43) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化122】

40



50

上記アミノ酸配列は、配列番号 43 である。

【0904】

(40-1) で合成したペプチド (38.3 mg, 17.8 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (17.8 μL, 35.6 μmol)、過酸化水素水 (36.4 μL, 356 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (18.6 mg, 8.70 μmol) を得た。

10

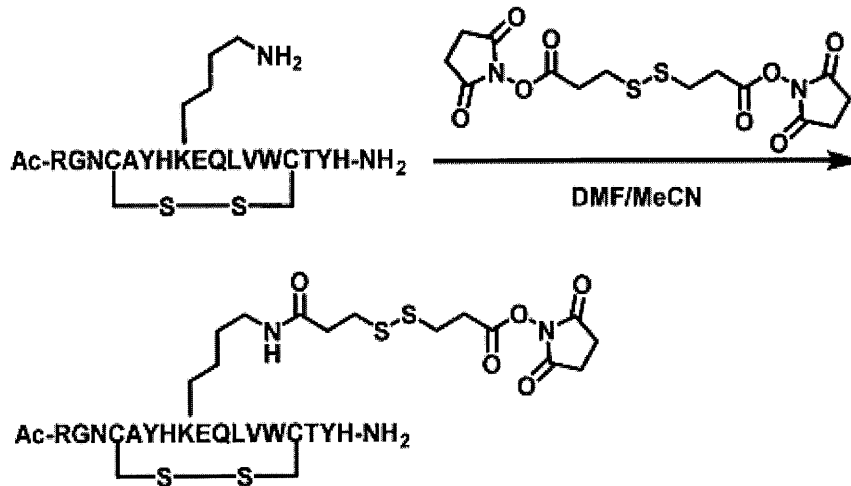
【0905】

MS (ESI) m/z : z = 3 716.65 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 537.80 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0906】

(40-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化123】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号 43 である。

【0907】

(40-2) で合成した Ac-RGNCA YHKEQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 43) (18.6 mg, 8.70 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (34.0 mg, 87.0 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.50 mg, 2.26 μmol) を得た。

40

【0908】

MS (ESI) m/z : z = 3 813.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 100%

【0909】

(40-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS

50



による解析

(40-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150535にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152865にピークが確認された。

【0910】

(40-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(40-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0911】

(40-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(40-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0912】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0913】

Retention Time 10.4891分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.8444分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図48)。

【0914】

(40-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(40-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0915】

[実施例41:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(41-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K F Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub>(配列番号44)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(19.5mg, 9.00μmol)を得た。

【0916】

10

20

30

40

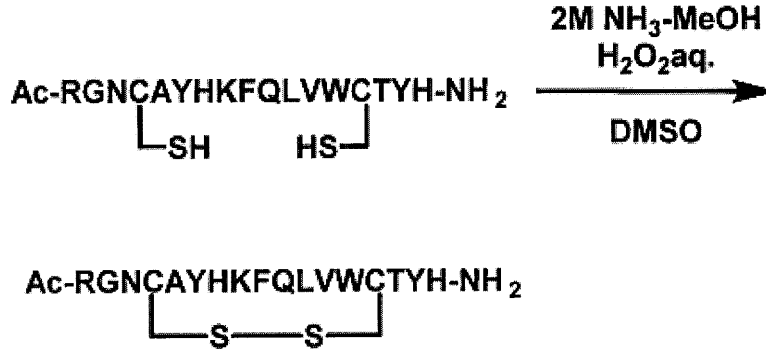
50

MS (ESI)  $m/z$  :  $z = 3$  723.25  $[M + 3H]^3+$ ,  $z = 4$  542.90  $[M + 4H]^4+$

【0917】

(41-2) Ac-RGNCA YHKFQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号44) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化124】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号44である。

【0918】

(41-1) で合成したペプチド (19.5 mg, 9.00  $\mu\text{mol}$ ) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (9.00  $\mu\text{L}$ , 18.0  $\mu\text{mol}$ )、過酸化水素水 (18.4  $\mu\text{L}$ , 180  $\mu\text{mol}$ ) を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (8.60 mg, 3.97  $\mu\text{mol}$ ) を得た。

20

【0919】

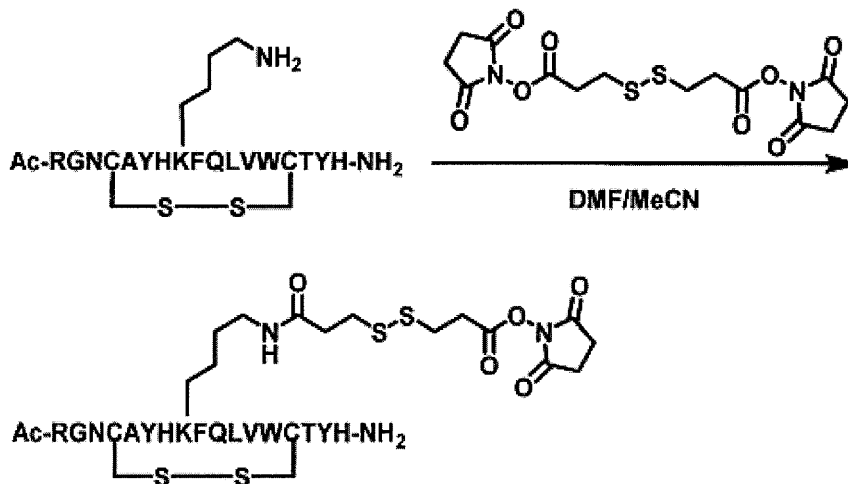
MS (ESI)  $m/z$  :  $z = 3$  722.75  $[M + 3H]^3+$ ,  $z = 4$  542.30  $[M + 4H]^4+$

30

【0920】

(41-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化125】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号44である。

【0921】

(41-2) で合成した Ac-RGNCA YHKFQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号44)

50

号44)(8.60mg, 3.97 $\mu$ mol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.50mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(32.0mg, 79.4 $\mu$ mol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.50mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(2.50mg, 1.02 $\mu$ mol)を得た。

10

【0922】

MS(ESI)m/z: z = 3 819.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 90%

【0923】

(41-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(41-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150972にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153454にピークが確認された。

20

【0924】

(41-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(41-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0925】

(41-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(41-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

40

【0926】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0927】

Retention Time 11.6662分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、13.0537分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物

50

であると考えられる (図 49)。

【0928】

(41-7) トラストズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(41-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0929】

[実施例42: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラストズマブの修飾およびその解析]

10

(42-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKRQLVWCT YH-NH<sub>2</sub>(配列番号45)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(46.2mg, 21.2μmol)を得た。

【0930】

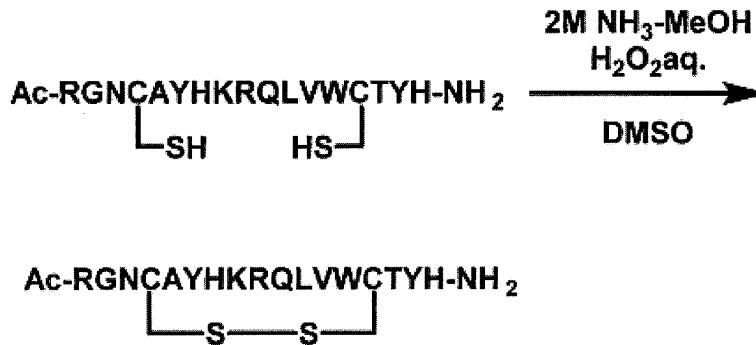
MS(ESI)m/z: z=3 726.30 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 545.10 [M+4H]<sup>4+</sup>

【0931】

(42-2) Ac-RGNCA YHKRQLVWCT YH-NH<sub>2</sub>(配列番号45)4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

20

【化126】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号45である。

【0932】

(42-1)で合成したペプチド(46.2mg, 21.2μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(21.2μL, 42.4μmol)、過酸化水素水(43.4μL, 42.4μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(29.6mg, 13.6μmol)を得た。

40

【0933】

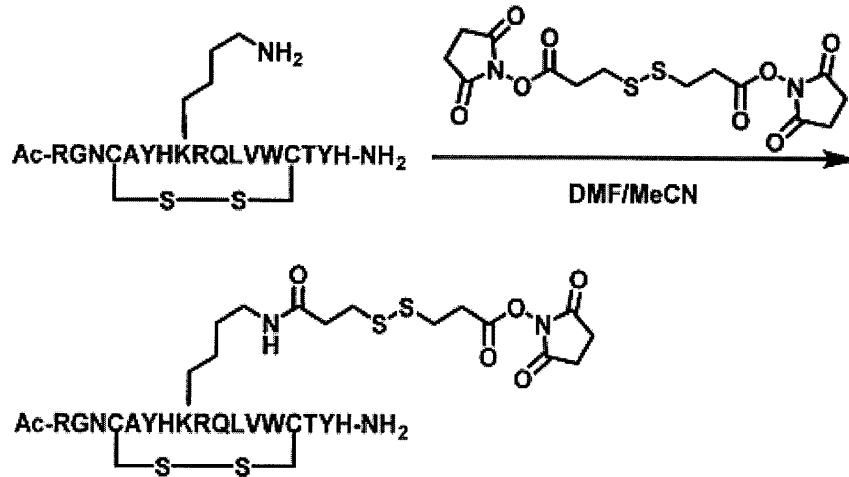
MS(ESI)m/z: z=3 725.10 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 544.65 [M+4H]<sup>4+</sup>

【0934】

(42-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

50

【化 1 2 7】



上記アミノ酸配列は、配列番号 45 である。

【0935】

(42-2) で合成した Ac-RGNCAYHKRQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 45) (29.6 mg, 13.6 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (55.0 mg, 136 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (6.00 mg, 2.44 μmol) を得た。

【0936】

MS (ESI) m/z : z = 4 616.85 [M + 4H]<sup>4+</sup>

HPLC 純度 : 100%

【0937】

(42-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(42-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150577 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152923 にピークが確認された。

【0938】

(42-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(42-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

10

20

30

40

50

オニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0939】

(42-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(42-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0940】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0941】

Retention Time 10.6918分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図50)。

【0942】

(42-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

20

実施例3の(3-1)記載の方法により、(42-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0943】

[実施例43: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(43-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K H Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号46)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(44.3 mg, 20.5 μmol)を得た。

30

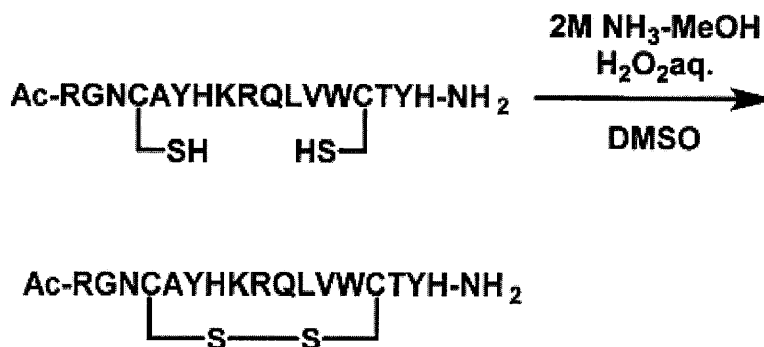
【0944】

MS (ESI) m/z: z = 3 720.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 540.30 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【0945】

(43-2) Ac-RGNCA Y H K H Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号46) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化128】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号46である。

50

## 【0946】

(43-1)で合成したペプチド(44.3mg, 20.5 μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(20.5 μL, 41.0 μmol)、過酸化水素水(41.9 μL, 410 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(26.0mg, 12.0 μmol)を得た。

10

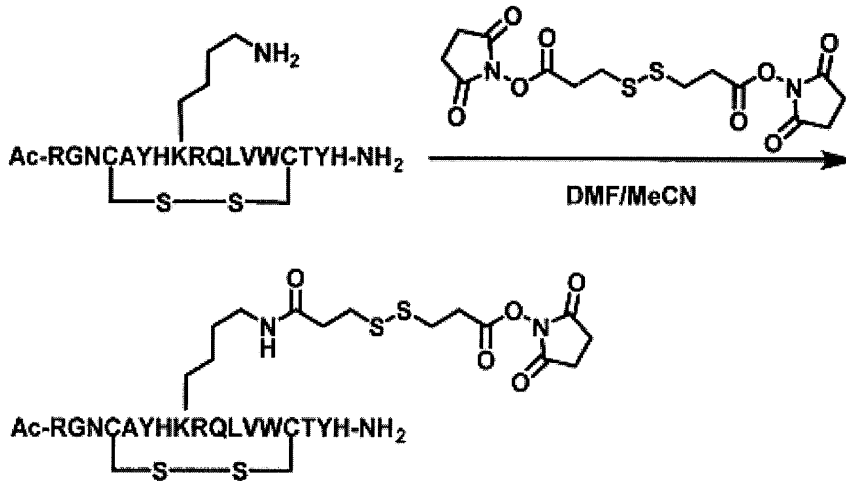
## 【0947】

MS(ESI)m/z: z = 3 719.60 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 540.10 [M + 4H]<sup>4+</sup>

## 【0948】

(43-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化129】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号46である。

## 【0949】

(43-2)で合成したAc-RGNCAYHKHQQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号46)(26.0mg, 12.0 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.50mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(49.0mg, 120 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.50mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(5.00mg, 2.05 μmol)を得た。

40

## 【0950】

MS(ESI)m/z: z = 4 612.15 [M + 4H]<sup>4+</sup>

HPLC純度: 69%

## 【0951】

(43-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

50

(43-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150549にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152879にピークが確認された。

【0952】

(43-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(43-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0953】

(43-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(43-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

20

【0954】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

30

【0955】

Retention Time 10.8257分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.4630分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図51)。

【0956】

(43-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(43-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

40

【0957】

[実施例44: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(44-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKWQLVWCT YH-NH<sub>2</sub>(配列番号47)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(29.0 mg, 13.1 µmol)を得た。

【0958】

MS(ESI)m/z: z = 3 736.25 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 552.65 [

50

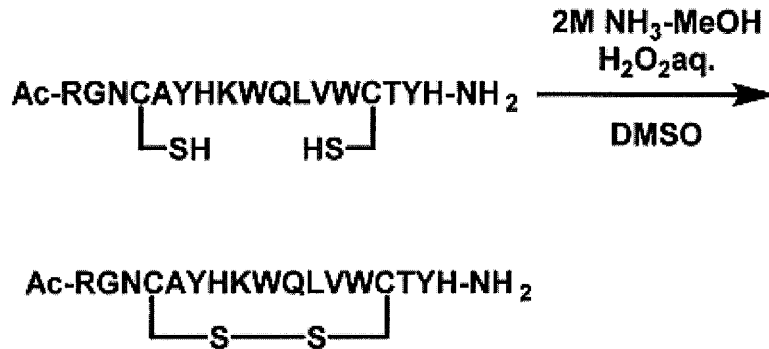


$M + 4H]^{4+}$

【0959】

(44-2) Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHKWQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号47) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化130】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号47である。

【0960】

(44-1) で合成したペプチド (29.0 mg, 13.1 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (13.1 μL, 26.2 μmol)、過酸化水素水 (26.8 μL, 262 μmol) を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (11.5 mg, 5.22 μmol) を得た。

20

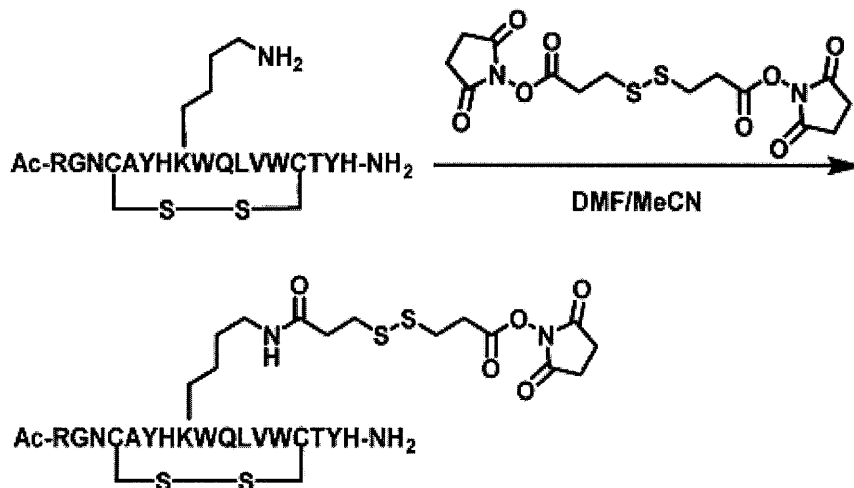
【0961】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  735.80  $[M + 3H]^{3+}$ ,  $z = 4$  552.10  $[M + 4H]^{4+}$

【0962】

(44-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化131】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号47である。

【0963】

(44-2) で合成した Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHKWQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号47) (11.5 mg, 5.22 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステイ

50

ンは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(21.0 mg, 52.0 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(3.00 mg, 1.20 μmol)を得た。

10

【0964】

MS (ESI) m/z : z = 3 832.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 93%

【0965】

(44-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(44-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が15.0595にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が15.3133にピークが確認された。

20

【0966】

(44-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(44-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0967】

(44-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(44-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【0968】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0969】

Retention Time 12.3049分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、14.1365分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図52)。

50

## 【0970】

(44-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(44-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

## 【0971】

[実施例45：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗H E R 2 I g G抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(45-1) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K Y Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号48)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(25.5 mg, 11.7 μmol)を得た。

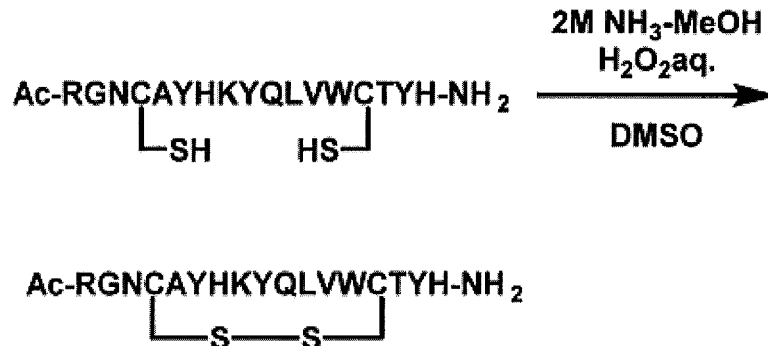
## 【0972】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 2 8 . 6 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>, z = 4 5 4 6 . 8 5 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

## 【0973】

(45-2) A c - R G N C A Y H K Y Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号48)4位と14位のC y s での分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化132】



上記アミノ酸配列は、配列番号48である。

## 【0974】

(45-1)で合成したペプチド(25.5 mg, 11.7 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H (11.7 μL, 23.4 μmol)、過酸化水素水(23.9 μL, 234 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(13.0 mg, 6.00 μmol)を得た。

## 【0975】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 2 8 . 0 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>, z = 4 5 4 6 . 3 5 [ M + 4 H ] <sup>4+</sup>

## 【0976】

(45-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

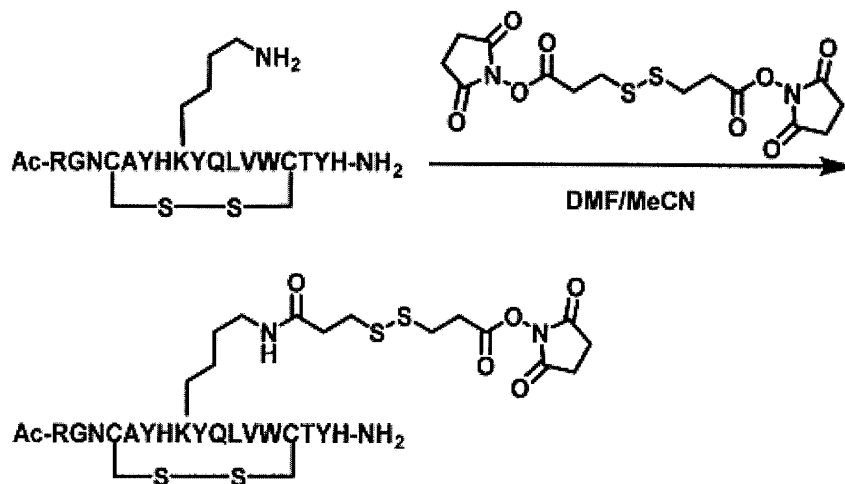
20

30

40

50

【化 1 3 3】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 48 である。

【0977】

(45-2) で合成した Ac-RGNCAYHKYQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 48) (13.0 mg, 6.00 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (24.0 mg, 60.0 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (3.80 mg, 1.54 μmol) を得た。

20

【0978】

MS (ESI) m/z : z = 3 824.50 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 100%

【0979】

(45-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(45-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150569 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 153086 にピークが確認された。

40

【0980】

(45-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(45-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

50

オニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0981】

(45-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(45-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0982】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0983】

Retention Time 11.5483分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.8948分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図53)。

【0984】

(45-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(45-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E UnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【0985】

[実施例46: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(46-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y F K G Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号49)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(19.5 mg, 9.35 μmol)を得た。

30

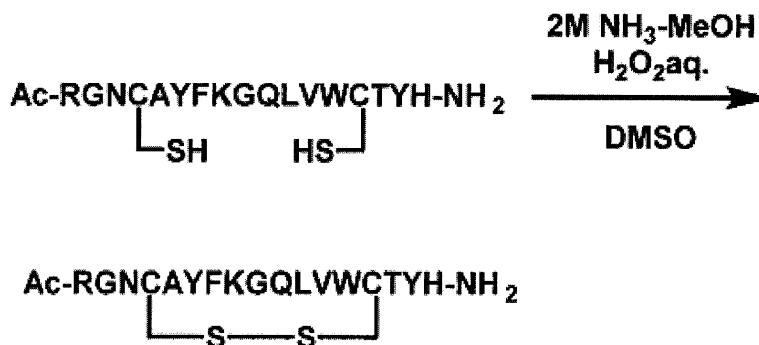
【0986】

MS (ESI) m/z: z = 3 696.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【0987】

(46-2) Ac-RGNCA Y F K G Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号49) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化134】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号49である。

50

## 【0988】

(46-1)で合成したペプチド(19.5 mg, 9.35 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH(9.35 μL, 18.7 μmol)、過酸化水素水(19.1 μL, 187 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(9.20 mg, 4.41 μmol)を得た。

10

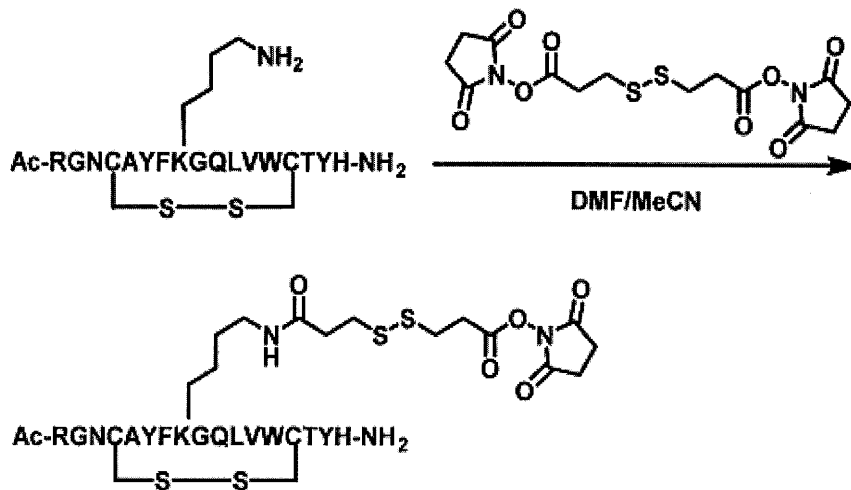
## 【0989】

MS(ESI)m/z: z = 3 696.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

## 【0990】

(46-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化135】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号49である。

30

## 【0991】

(46-2)で合成したAc-RGNCA YFKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号49)(9.20 mg, 4.41 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(71.4 mg, 176 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(1.50 mg, 0.63 μmol)を得た。

40

## 【0992】

MS(ESI)m/z: z = 3 792.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 75%

## 【0993】

(46-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(46-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,

50

N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150661にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153059にピークが確認された。

【0994】

(46-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(46-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0995】

(46-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(46-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A\_Buffer:0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer:0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0996】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【0997】

Retention Time 10.7238分はトラスツズマブ原料、11.4697分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.0713分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図54)。

【0998】

(46-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(46-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【0999】

[実施例47:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(47-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAYYKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号50)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(29.6 mg, 14.1 µmol)を得た。

【1000】

MS(ESI)m/z: z = 3 702.05 [M+3H]<sup>3+</sup>

【1001】

10

20

30

40

50

(47-2) Ac-RGNCAYYKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号50) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化136】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号50である。

【1002】

(47-1)で合成したペプチド(29.6mg, 14.1μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(14.1μL, 28.2μmol)、過酸化水素水(28.8μL, 282μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(12.1mg, 5.76μmol)を得た。

20

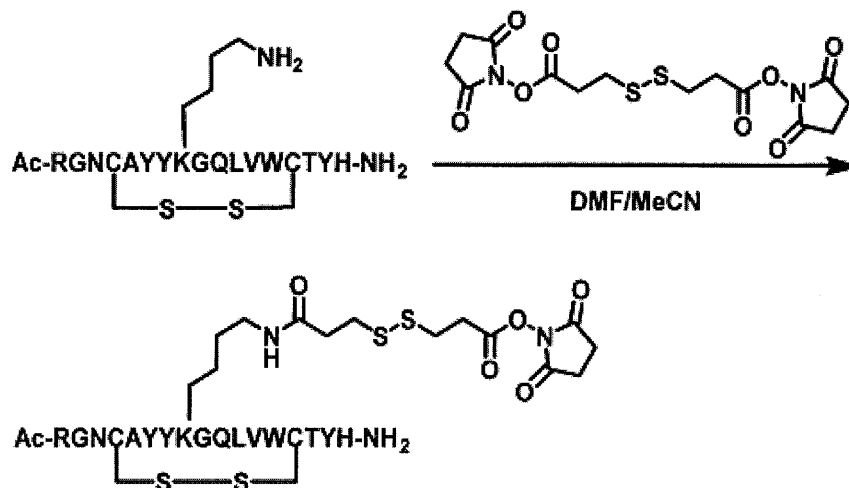
【1003】

MS(ESI)m/z: z = 3 701.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1004】

(47-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化137】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号50である。

【1005】

(47-2)で合成したAc-RGNCAYYKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号50)(12.1mg, 5.76μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(70.0mg, 173μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL

50



)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(2.70mg, 1.13 $\mu$ mol)を得た。

【1006】

MS (ESI) m/z : z = 3 797.65 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 77%

10

【1007】

(47-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(47-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150497にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152779にピークが確認された。

20

【1008】

(47-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(47-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1009】

(47-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(47-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【1010】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1011】

Retention Time 10.6845分はトラスツズマブ原料、11.2951分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.1562分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図55)。

【1012】

(47-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(47-4)で得られた抗体・ペプチド複合

50

体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1013】

[実施例48：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗H E R 2 I g G抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(48-1) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y W K G Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号51)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(36.5 mg, 17.2 μmol)を得た。

【1014】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 7 0 9 . 6 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【1015】

(48-2) A c - R G N C A Y W K G Q L V W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号51)4位と14位のC y sでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化138】



上記アミノ酸配列は、配列番号51である。

【1016】

(48-1)で合成したペプチド(36.5 mg, 17.2 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H (17.2 μL, 34.4 μmol)、過酸化水素水(35.1 μL, 34.4 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(15.9 mg, 7.48 μmol)を得た。

【1017】

M S ( E S I ) m / z : z = 3 8 0 5 . 6 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【1018】

(48-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

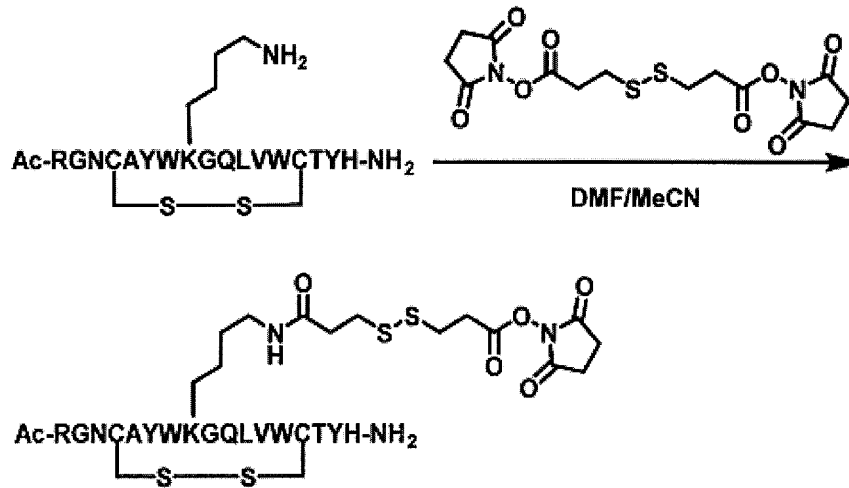
20

30

40

50

【化 1 3 9】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 51 である。

【1019】

(48-2) で合成した Ac-RGNCAYWKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 51) (15.9 mg, 7.48 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.30 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (60.7 mg, 150 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (6.0 mg, 2.49 μmol) を得た。

20

【1020】

MS (ESI) m/z : z = 3 795.35 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 97%

30

【1021】

(48-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(48-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150529 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152819 にピークが確認された。

40

【1022】

(48-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(48-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

50

オニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1023】

(48-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(48-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【1024】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1025】

Retention Time 11.6714分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.3776分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図56)。

【1026】

(48-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(48-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E NumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【1027】

[実施例49: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(49-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y R K G Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号52)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(46.6 mg, 22.2 μmol)を得た。

30

【1028】

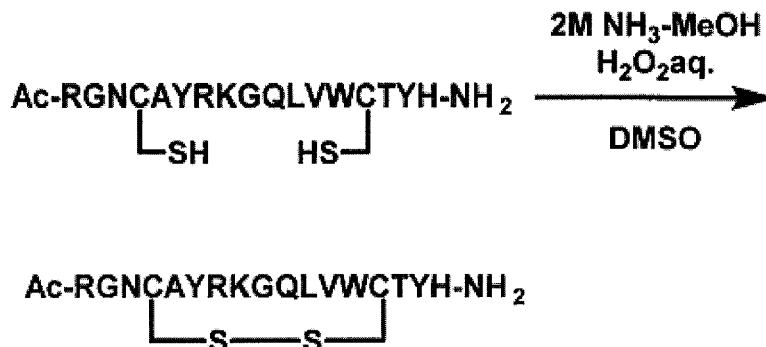
MS (ESI) m/z: z = 3 699.65 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 525.15 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【1029】

(49-2) Ac-RGNCA Y R K G Q L V W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号52) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化140】

40



50

上記アミノ酸配列は、配列番号52である。

【1030】

(49-1)で合成したペプチド(46.6mg, 22.2 $\mu$ mol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(22.2 $\mu$ L, 44.4 $\mu$ mol)、過酸化水素水(45.4 $\mu$ L, 444 $\mu$ mol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(32.2mg, 15.4 $\mu$ mol)を得た。

10

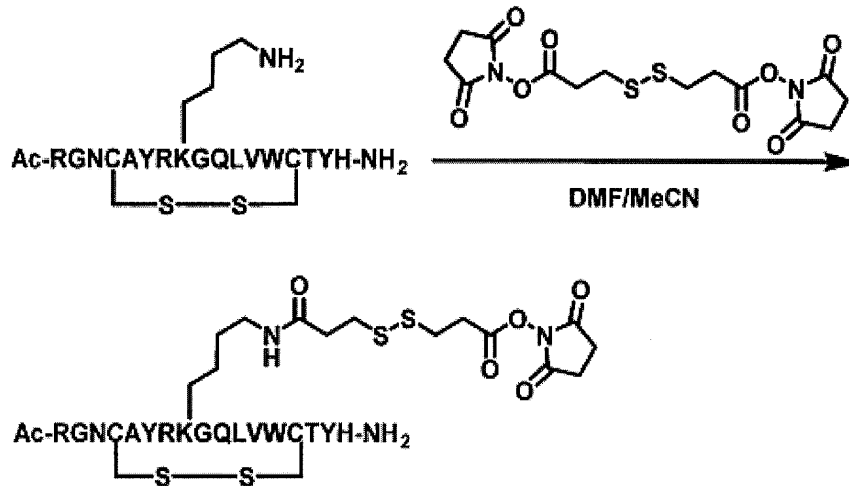
【1031】

MS(ESI)m/z: z = 3 699.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>、z = 4 524.50 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【1032】

(49-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化141】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号52である。

【1033】

(49-2)で合成したAc-RGNCAYRKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号52)(32.2mg, 15.4 $\mu$ mol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.30mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(125mg, 308 $\mu$ mol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(10.2mg, 4.28 $\mu$ mol)を得た。

40

【1034】

MS(ESI)m/z: z = 3 795.35 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 97%

【1035】

(49-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS

50

による解析

(49-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148222にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150492にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152761にピークが確認された。

【1036】

(49-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(49-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1037】

(49-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(49-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0, B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【1038】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1039】

Retention Time 10.7246分はトラスツズマブ原料、11.4944分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、12.1645分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図57)。

【1040】

(49-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(49-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1041】

[実施例50:抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(50-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y G K G Q L V W C T Y H-NH<sub>2</sub>(配列番号53)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(31.9mg, 16.0μmol)を得た。

10

20

30

40

50

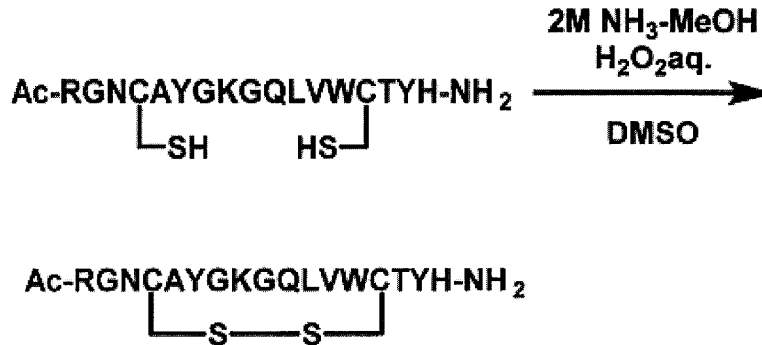
【1042】

MS (ESI) m/z : z = 3 666.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1043】

(50-2) Ac-RGNCA YGKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号53) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化142】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号53である。

【1044】

(50-1)で合成したペプチド(31.9 mg, 16.0 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(16.0 μL, 32.0 μmol)、過酸化水素水(32.7 μL, 320 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(17.4 mg, 8.72 μmol)を得た。

20

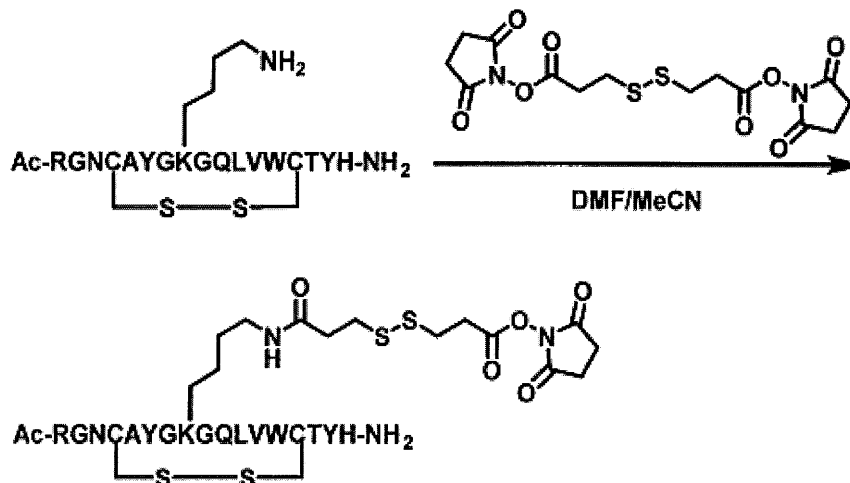
【1045】

MS (ESI) m/z : z = 3 665.95 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1046】

(50-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化143】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号53である。

【1047】

(50-2)で合成したAc-RGNCA YGKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号53) (17.4 mg, 8.72 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステイ

50

ンは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.30 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(70.3 mg, 174 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(4.70 mg, 2.06 μmol)を得た。

10

【1048】

MS (ESI) m/z : z = 3 762.30 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 94%

【1049】

(50-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(50-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148219にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150402にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152561にピークが確認された。

20

【1050】

(50-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(50-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1051】

(50-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(50-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【1052】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

【1053】

Retention Time 10.6965分はトラスツズマブ原料、11.3624分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.9441分はペプチド

50



が2個導入された化合物であると考えられる(図58)。

【1054】

(50-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(50-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1055】

[実施例51: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(51-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCA Y H K G Q L V W C - N H <sub>2</sub> (配列番号54)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(76.9 mg, 52.5 μmol)を得た。

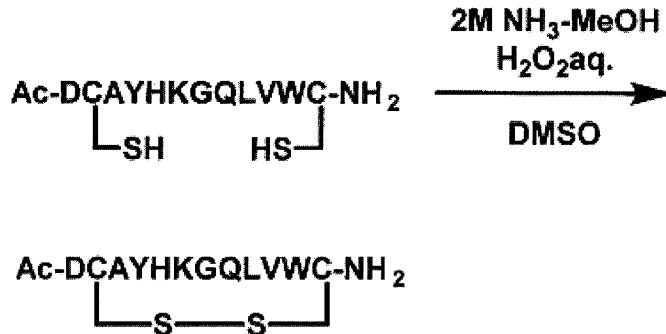
【1056】

MS (ESI) m/z : z = 2 732.65 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【1057】

(51-2) Ac-DCA Y H K G Q L V W C - N H <sub>2</sub> (配列番号54) 2位と12位のC y sでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化144】



上記アミノ酸配列は、配列番号54である。

【1058】

(51-1)で合成したペプチド(76.9 mg, 52.5 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H (52.5 μL, 105 μmol)、過酸化水素水(107 μL, 1.05 mmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(35.9 mg, 24.6 μmol)を得た。

【1059】

MS (ESI) m/z : z = 2 731.60 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【1060】

(51-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

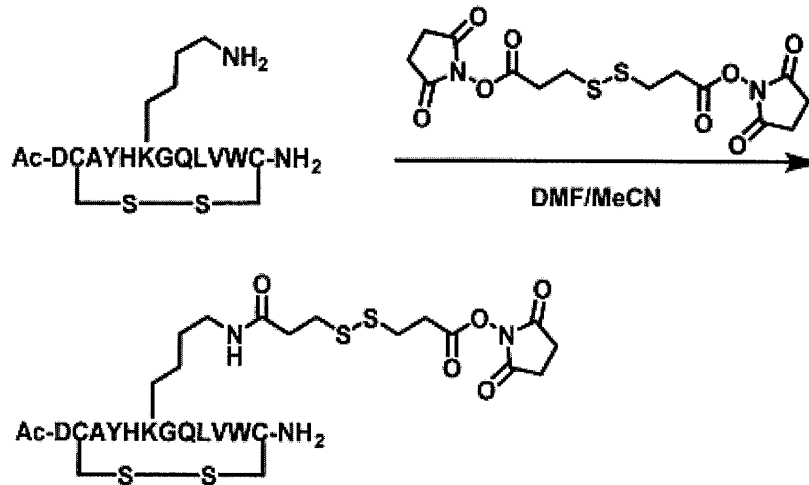
20

30

40

50

【化 1 4 5】



上記アミノ酸配列は、配列番号 5 4 である。

【 1 0 6 1】

(51-2) で合成した Ac-DcAYHKGQLVWC-NH<sub>2</sub> (配列番号 5 4) (35.9 mg, 24.6 μmol、ただし 2 番目と 1 2 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (39.8 mg, 98.4 μmol) をアセトニトリル (1.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (16.0 mg, 9.14 μmol) を得た。

【 1 0 6 2】

MS (ESI) m/z : z = 2 876.50 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC 純度 : 89%

【 1 0 6 3】

(51-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(51-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 151487 にピークが確認された。

【 1 0 6 4】

(51-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(51-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50685、50844 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピー

10

20

30

40

50

クが観測された。

【1065】

(51-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(51-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【1066】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1067】

Retention Time 12.5802分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる(図59)。

【1068】

(51-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(51-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E NumberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【1069】

[実施例52: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(52-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-NCA Y H K G Q L V W C - NH<sub>2</sub> (配列番号55)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(78.6 mg, 53.7 μmol)を得た。

30

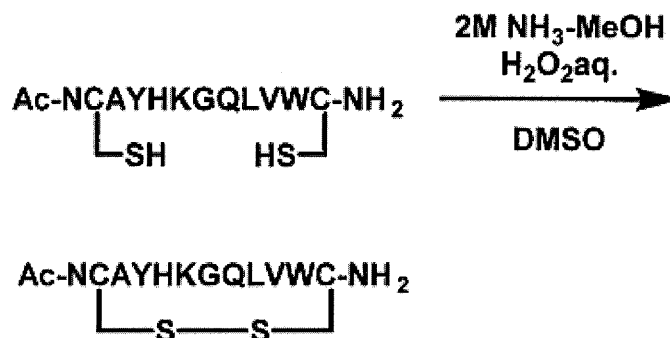
【1070】

MS (ESI) m/z: z = 2 732.25 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【1071】

(52-2) Ac-NCA Y H K G Q L V W C - NH<sub>2</sub> (配列番号55) 2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化146】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号55である。

【1072】

(52-1)で合成したペプチド(78.6 mg, 53.7 μmol)をDMSO(5

50

. 0 0 m L ) に溶解し、2 M  $\text{NH}_3$  - MeOH ( 5 3 . 7  $\mu\text{L}$  , 1 0 7  $\mu\text{mol}$  )、過酸化水素水 ( 1 0 9  $\mu\text{L}$  , 1 . 0 7 m m o l ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 2 8 . 0 m g , 1 9 . 2  $\mu\text{mol}$  ) を得た。

【 1 0 7 3 】

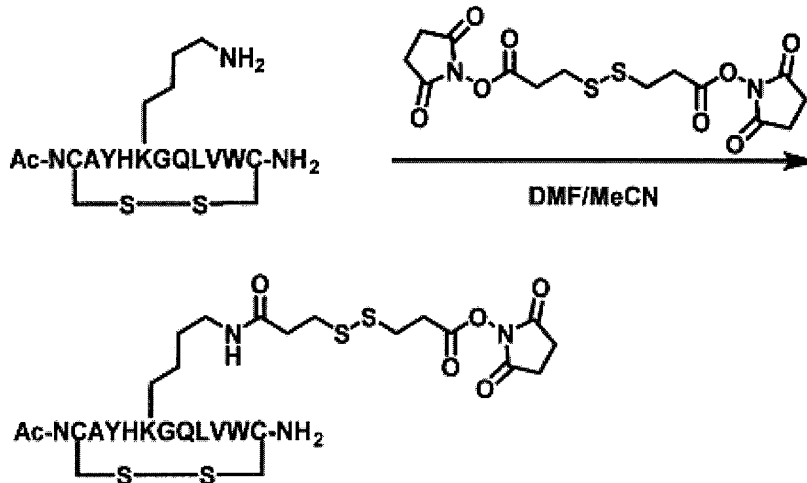
MS (ESI) m / z : z = 2 7 3 1 . 2 0 [ M + 2 H ] <sup>2+</sup>

10

【 1 0 7 4 】

( 5 2 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【 化 1 4 7 】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 5 5 である。

【 1 0 7 5 】

( 5 2 - 2 ) で合成した Ac - N c A Y H K G Q L V W C - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 5 5 ) ( 2 8 . 0 m g , 1 9 . 2  $\mu\text{mol}$ 、ただし 2 番目と 1 2 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N , N - ジメチルホルムアミド ( 1 . 0 0 m L ) に溶解し、3 , 3 ' - ジチオジプロピオン酸ジ ( N - スクシンイミジル ) ( 3 1 1 m g , 7 6 8  $\mu\text{mol}$  ) をアセトニトリル ( 1 . 5 0 m L ) に溶解した溶液を加え、室温で 2 4 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ( 1 1 . 5 m g , 6 . 5 7  $\mu\text{mol}$  ) を得た。

30

40

【 1 0 7 6 】

MS (ESI) m / z : z = 2 8 7 5 . 7 5 [ M + 2 H ] <sup>2+</sup>

HPLC 純度 : 9 3 %

【 1 0 7 7 】

( 5 2 - 4 ) 抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの特異的修飾と E S I - T O F M S による解析

( 5 2 - 3 ) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体は N , N ' - ジメチルホルムアミドに溶解し 2 1 . 6 m M とした。抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブ ( 中外製薬 ) 5 0 0  $\mu\text{g}$  を 6 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー ( p H 4 . 7 )

50

46.9  $\mu\text{L}$ に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$  (抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151322にピークが確認された。

【1078】

(52-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(52-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$  (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

10

【1079】

(52-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(52-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5  $\mu\text{m}$ を使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

20

【1080】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1081】

Retention Time 10.9785分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.9575分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図60)。

30

【1082】

(52-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(52-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1083】

[実施例53: 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

40

(53-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-CAYHKGQLVWCT-NH<sub>2</sub> (配列番号56)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(63.8 mg, 44.0  $\mu\text{mol}$ )を得た。

【1084】

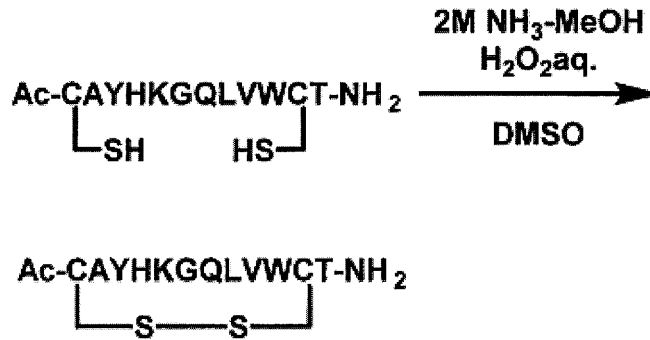
MS (ESI) m/z: z = 2 725.70 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【1085】

(53-2) Ac-CAYHKGQLVWCT-NH<sub>2</sub> (配列番号56) 1位と11位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

50

【化 1 4 8】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 56 である。

【1086】

(53-1) で合成したペプチド (63.8 mg, 44.0 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (44.0 μL, 88.0 μmol)、過酸化水素水 (89.9 μL, 880 mmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (24.7 mg, 17.1 μmol) を得た。

20

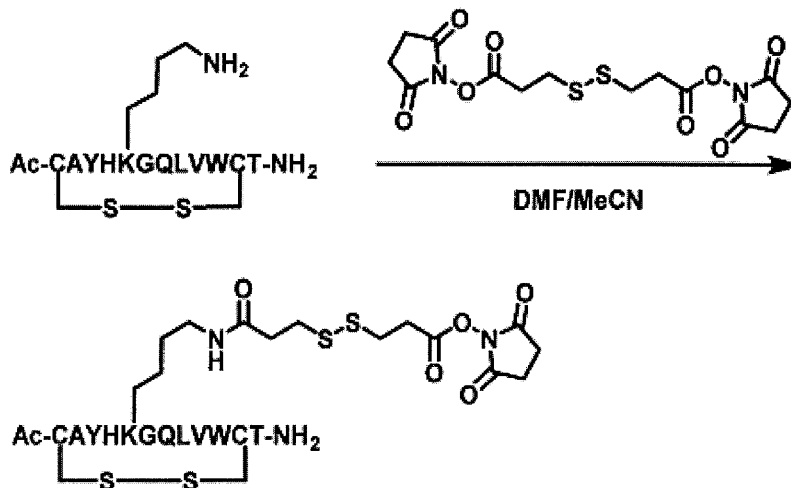
【1087】

MS (ESI) m/z : z = 2 724.35 [M + 2H]<sup>2+</sup>

【1088】

(53-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 1 4 9】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号 56 である。

【1089】

(53-2) で合成した Ac-CAYHKGQLVWCT-NH<sub>2</sub> (配列番号 56) (24.7 mg, 17.1 μmol、ただし 1 番目と 11 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (277 mg, 684 μmol) をアセトニトリル (1.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを

40

充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(9.00mg, 5.18 $\mu$ mol)を得た。

【1090】

MS (ESI) m/z : z = 2 869.30 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC 純度 : 77%

【1091】

(53-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析 10

(53-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151305にピークが確認された。

【1092】

(53-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認 20

(53-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1093】

(53-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(53-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【1094】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量; 40

【1095】

Retention Time 11.6359分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、13.0051分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図61)。

【1096】

(53-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(53-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

## 【1097】

[実施例54：抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

## (54-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-CAYHKSQLVWC-NH<sub>2</sub>（配列番号57）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（68.3mg, 49.5μmol）を得た。

## 【1098】

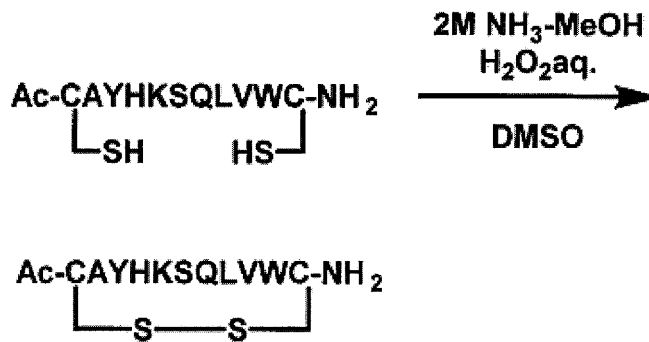
MS (ESI) m/z : z = 2 690.20 [M + 2H]<sup>2+</sup>

10

## 【1099】

(54-2) Ac-CAYHKSQLVWC-NH<sub>2</sub>（配列番号57）1位と11位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化150】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号57である。

## 【1100】

(54-1)で合成したペプチド（68.3mg, 49.5μmol）をDMSO（5.00mL）に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH（49.5μL, 99.0μmol）、過酸化水素水（101μL, 990mmol）を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（30.4mg, 22.1μmol）を得た。

30

## 【1101】

MS (ESI) m/z : z = 2 689.15 [M + 2H]<sup>2+</sup>

## 【1102】

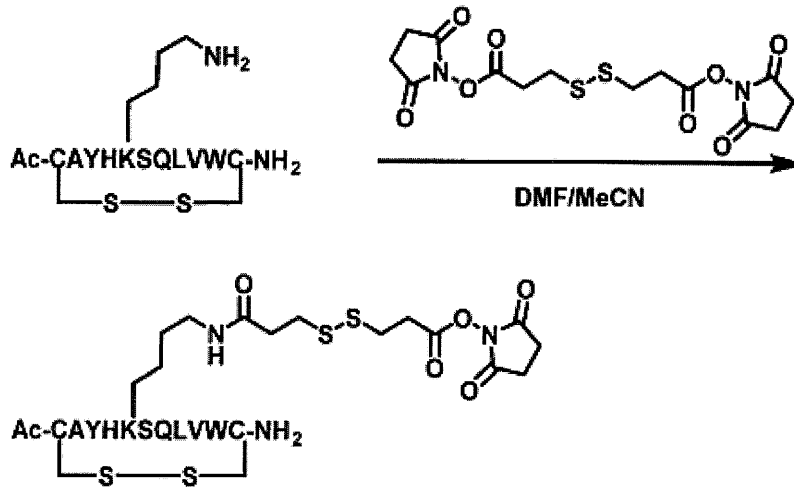
(54-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

40

50



【化 1 5 1】



上記アミノ酸配列は、配列番号 57 である。

【1103】

(54-2) で合成した Ac-CAYHKSQLVWC-NH<sub>2</sub> (配列番号 57) (30.4 mg, 22.1 μmol、ただし 1 番目と 11 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (179 mg, 442 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (12.0 mg, 7.20 μmol) を得た。

【1104】

MS (ESI) m/z : z = 2 833.85 [M + 2H]<sup>2+</sup>

HPLC 純度 : 96%

【1105】

(54-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(54-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 149771 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 151326 にピークが確認された。

【1106】

(54-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(54-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、50756 に重鎖ピーク、23440 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピ

10

20

30

40

50

オニル基が導入された50685、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1107】

(54-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(54-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【1108】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1109】

Retention Time 11.7194分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、13.0651分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図62)。

【1110】

(54-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(54-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E UnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【1111】

[実施例55: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(55-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAWHKQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号68)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(58.4 mg, 27.6 μmol)を得た。

30

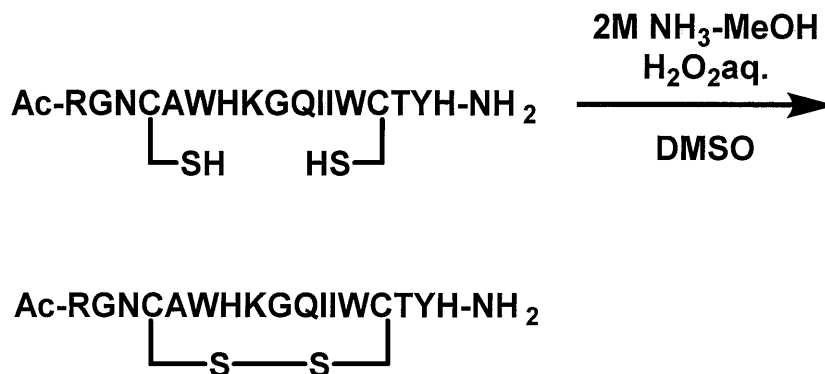
【1112】

MS (ESI) m/z: z = 4 529.65 [M+3H]<sup>3+</sup>

【1113】

(55-2) Ac-RGNCAWHKQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号68) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化152】



40

50

上記アミノ酸配列は、配列番号 68 である。

【1114】

(55-1) で合成したペプチド (58.4 mg, 27.6 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (27.6 μL, 55.2 μmol)、過酸化水素水 (56.4 μL, 552 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (29.3 mg, 13.9 μmol) を得た。

10

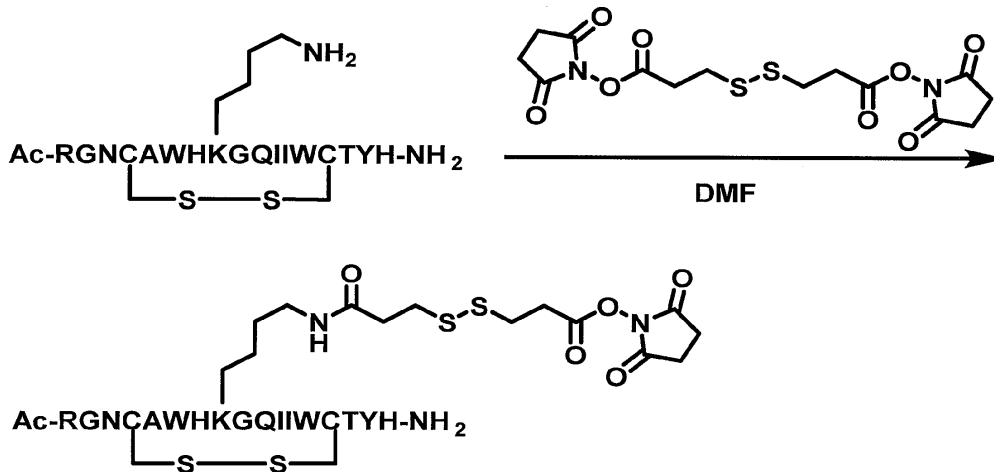
【1115】

MS (ESI) m/z : z = 4 529.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1116】

(55-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化153】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 68 である。

【1117】

(55-2) で合成した Ac-RGNC(AWHK)GQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 68) (29.3 mg, 13.9 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (112 mg, 278 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (14.5 mg, 6.04 μmol) を得た。

30

【1118】

MS (ESI) m/z : z = 3 801.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 88%

【1119】

(55-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

40

(55-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,

50

N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファ( pH 4.7 ) 46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファ( pH 2.9 )に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150690にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152796にピークが確認された。

【1120】

(55-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認 10

(55-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1121】

(55-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析 20

(55-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【1122】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量; 30

【1123】

Retention Time 12.3918分はペプチドが1個導入された化合物、13.5178分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図63)。

【1124】

(55-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(55-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1125】

[実施例56:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(56-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAFHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号69)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(78.2 mg, 37.7 µmol)を得た。

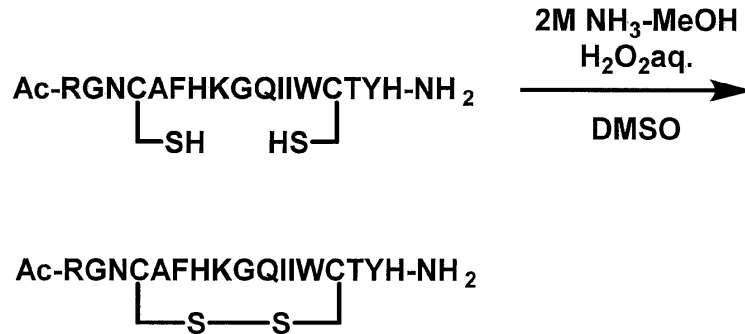
【1126】

MS(ESI) m/z: z = 4 519.80 [M+3H]<sup>3+</sup>

【1127】

(56-2) Ac-RGNCAFHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号69) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化154】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号69である。

【1128】

(56-1)で合成したペプチド(78.2mg, 37.7μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(37.7μL, 75.4μmol)、過酸化水素水(77.0μL, 754μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(46.9mg, 22.6μmol)を得た。

20

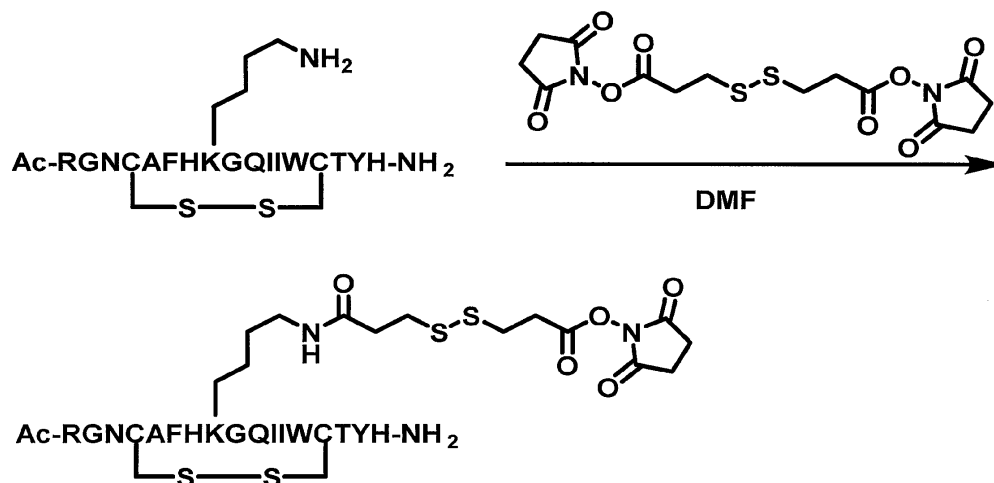
【1129】

MS(ESI)m/z: z = 4 519.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1130】

(56-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化155】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号69である。

【1131】

(56-2)で合成したAc-RGNCAFHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号69)(46.9mg, 22.6μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(183mg, 452μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.80mL)

50

に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(18.5mg, 7.83mol)を得た。

【1132】

MS (ESI) m/z : z = 3 788.60 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 89%

10

【1133】

(56-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(56-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150368にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152717にピークが確認された。

20

【1134】

(56-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(56-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1135】

(56-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(56-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

40

【1136】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1137】

Retention Time 12.2498分はペプチドが1個導入された化合物、13.1829分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図64)。

【1138】

(56-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(56-4)で得られた抗体・ペプチド複合

50

体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1139】

[実施例57：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(57-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAHHKQI IWCTYH-NH<sub>2</sub>（配列番号70）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（98.6 mg, 47.7 μmol）を得た。

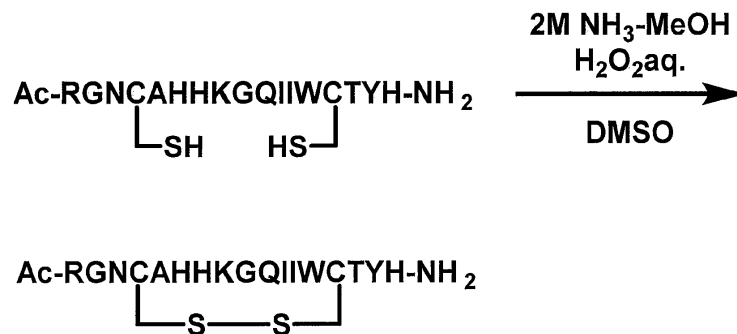
【1140】

MS (ESI) m/z : z = 4 517.25 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1141】

(57-2) Ac-RGNCAHHKQI IWCTYH-NH<sub>2</sub>（配列番号70）4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化156】



上記アミノ酸配列は、配列番号70である。

【1142】

(57-1)で合成したペプチド（98.6 mg, 47.7 μmol）をDMSO（5.00 mL）に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH（47.7 μL, 95.4 μmol）、過酸化水素水（97.4 μL, 95.4 μmol）を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（90.3 mg, 43.7 μmol）を得た。

【1143】

MS (ESI) m/z : z = 4 516.85 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1144】

(57-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

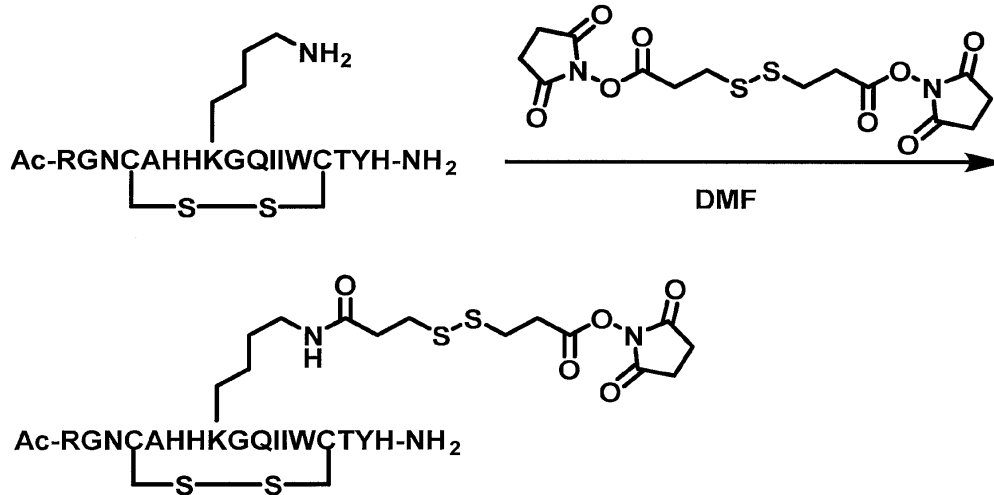
20

30

40

50

【化 1 5 7】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 70 である。

【1145】

(57-2) で合成した Ac-RGNC(AH)HKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 70) (90.3 mg, 43.7 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (353 mg, 874 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.20 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (22.5 mg, 9.56 μmol) を得た。

20

【1146】

MS (ESI) m/z : z = 4 589.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>  
HPLC 純度 : 60%

30

【1147】

(57-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(57-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148236 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150466 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152702 にピークが確認された。

40

【1148】

(57-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(57-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。

50



E S I - T O F M S により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 5 0 5 9 5、5 0 7 5 6 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 5 0 6 8 2、5 0 8 4 4 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

【 1 1 4 9 】

( 5 7 - 6 ) 抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの特異的修飾の H I C - U P L C 解析 ( 5 7 - 4 ) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を H I C により解析した。カラムは P r o t e i n - P a k H i R e s H I C C o l u m n ( W a t e r s ) 4 . 6 x 1 0 0 m m 2 . 5 μ m を使用した。A \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , 2 . 3 M ( N H 4 ) 2 S O 4 , p H 7 . 0、B \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , p H 7 . 0 にて流速は 0 . 6 m l / m i n、グラジエントを A 6 0 % B 4 0 % A 0 % B 1 0 0 %、1 6 m i n ( データ採取 2 0 m i n )、カラム温度は 4 0、サーモスタット温度は 4 0、検出器は 2 8 0 n m の波長で検出した。

10

【 1 1 5 0 】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 3 0 等量 ;

【 1 1 5 1 】

R e t e n s i o n T i m e 1 1 . 0 7 5 3 分はトラスツズマブ原料、1 1 . 6 4 2 0 分はペプチドが 1 個導入された化合物、1 2 . 1 1 1 8 分はペプチドが 2 個導入された化合物であると考えられる ( 図 6 5 )。

20

【 1 1 5 2 】

( 5 7 - 7 ) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 5 7 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 1 1 5 3 】

[ 実施例 5 8 : 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

30

( 5 8 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C G Y H K G Q I I W C T Y H - N H 2 ( 配列番号 7 1 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 8 8 . 7 m g , 4 2 . 7 μ m o l ) を得た。

【 1 1 5 4 】

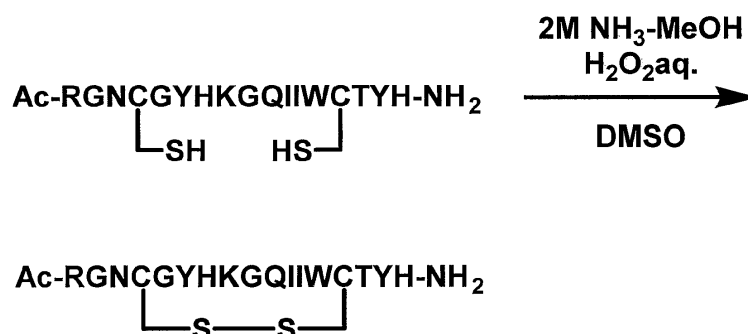
M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 2 0 . 2 5 [ M + 3 H ] 3 +

【 1 1 5 5 】

( 5 8 - 2 ) A c - R G N C G Y H K G Q I I W C T Y H - N H 2 ( 配列番号 7 1 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

40

【 化 1 5 8 】



50

上記アミノ酸配列は、配列番号 71 である。

【1156】

(58-1) で合成したペプチド (88.7 mg, 42.7 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (42.7 μL, 85.4 μmol)、過酸化水素水 (87.2 μL, 854 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (66.3 mg, 31.9 μmol) を得た。

10

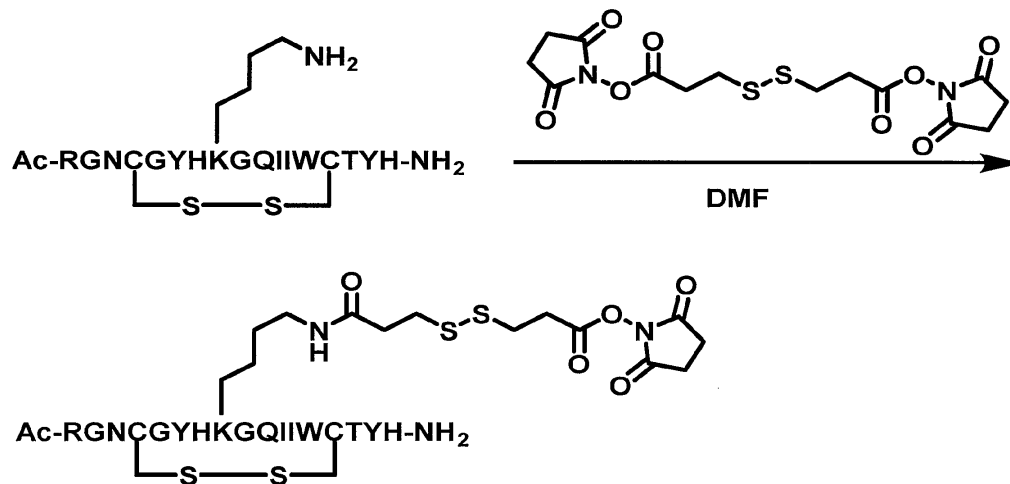
【1157】

MS (ESI) m/z : z = 4 519.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1158】

(58-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化159】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 71 である。

【1159】

(58-2) で合成した Ac-RGNCGYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 71) (66.3 mg, 31.9 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (258 mg, 638 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.80 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (24.5 mg, 10.4 μmol) を得た。

40

【1160】

MS (ESI) m/z : z = 3 789.25 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 85%

【1161】

(58-4) 抗 HER2 IgG 抗体 トラスツズマブ の特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

50

(58-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148229にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150477にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152892にピークが確認された。

10

## 【1162】

(58-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(58-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50685、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

## 【1163】

(58-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(58-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0, B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

20

## 【1164】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

30

## 【1165】

Retention Time 10.4246分はトラスツズマブ原料、11.4281分はペプチドが1個導入された化合物、12.2920分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図66)。

## 【1166】

(58-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(58-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

40

## 【1167】

[実施例59:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(59-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCLYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号72)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(54.8mg, 25.7μmol)を得た。

50

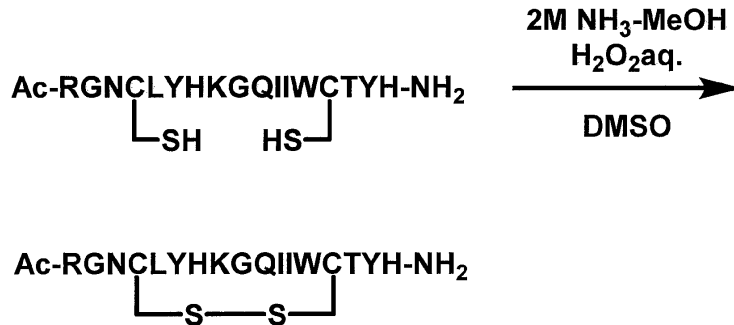
【 1 1 6 8 】

MS (ESI) m/z : z = 4 534 . 45 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【 1 1 6 9 】

( 5 9 - 2 ) Ac - RGNCLYHKGQIIWCTYH - NH<sub>2</sub> ( 配列番号 7 2 ) 4 位と 1 4 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 1 6 0 】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 7 2 である。

【 1 1 7 0 】

( 5 9 - 1 ) で合成したペプチド ( 5 4 . 8 mg , 2 5 . 7 μmol ) を DMSO ( 5 . 0 0 mL ) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub> - MeOH ( 2 5 . 7 μL , 5 1 . 4 μmol )、過酸化水素水 ( 5 2 . 5 μL , 5 1 4 μmol ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 2 7 . 8 mg , 1 3 . 0 μmol ) を得た。

20

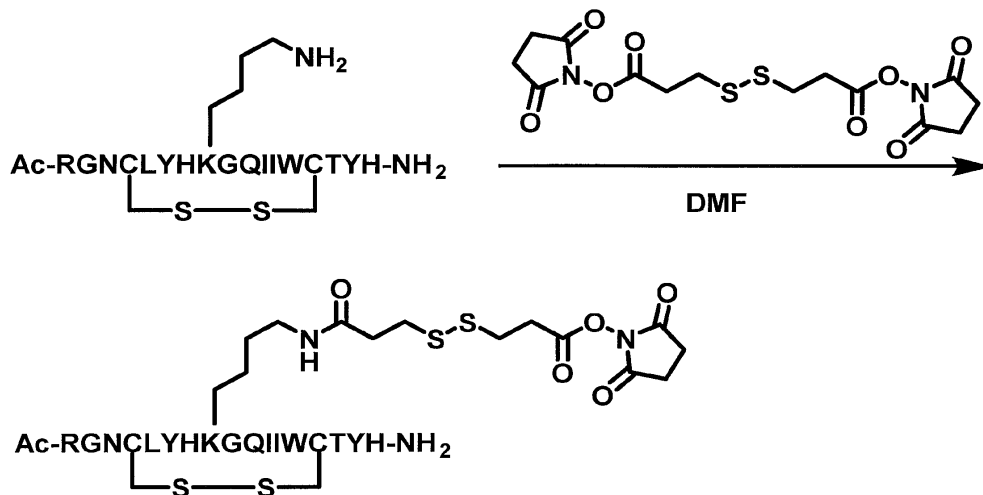
【 1 1 7 1 】

MS (ESI) m/z : z = 4 533 . 85 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【 1 1 7 2 】

( 5 9 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【 化 1 6 1 】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号 7 2 である。

【 1 1 7 3 】

( 5 9 - 2 ) で合成した Ac - RGNCLYHKGQIIWCTYH - NH<sub>2</sub> ( 配列番号 7 2 ) ( 2 7 . 8 mg , 1 3 . 0 μmol 、ただし 4 番目と 1 4 番目の 2 つのシステイ

50

ンは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(105 mg, 260 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(18.8 mg, 7.77 mol)を得た。

10

【1174】

MS (ESI) m/z : z = 3 807.80 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 84%

【1175】

(59-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(59-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150691にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152838にピークが確認された。

20

【1176】

(59-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(59-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1177】

(59-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(59-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【1178】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量 ;

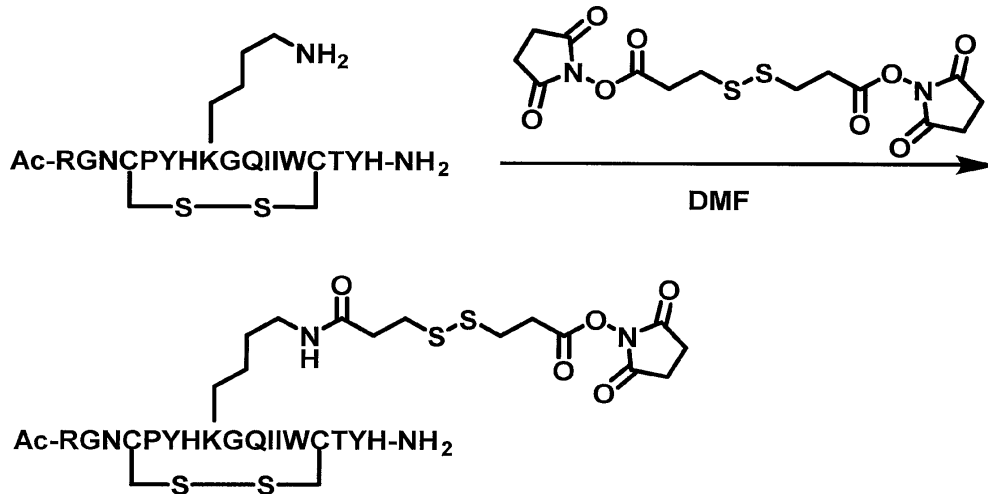
【1179】

Retention Time 11.4592分はペプチドが1個導入された化合物、12.2146分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図67)。

50



【化 1 6 3】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 73 である。

【1187】

(60-2) で合成した Ac-RGNCPYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 73) (49.1 mg, 23.2 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (188 mg, 464 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.80 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (19.4 mg, 8.07 mol) を得た。

20

【1188】

MS (ESI) m/z : z = 3 802.45 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 87%

【1189】

(60-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(60-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148225 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150513 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 153398 にピークが確認された。

40

【1190】

(60-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(60-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。

50

E S I - T O F M S により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 5 0 5 9 5、5 0 7 5 6 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 5 0 6 8 4、5 0 8 4 5 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

【 1 1 9 1 】

( 6 0 - 6 ) 抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの特異的修飾の H I C - U P L C 解析 ( 6 0 - 4 ) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を H I C により解析した。カラムは P r o t e i n - P a k H i R e s H I C C o l u m n ( W a t e r s ) 4 . 6 x 1 0 0 m m 2 . 5 μ m を使用した。A \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , 2 . 3 M ( N H 4 ) 2 S O 4 , p H 7 . 0、B \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , p H 7 . 0 にて流速は 0 . 6 m l / m i n、グラジエントを A 6 0 % B 4 0 % A 0 % B 1 0 0 %、1 6 m i n ( データ採取 2 0 m i n )、カラム温度は 4 0、サーモスタット温度は 4 0、検出器は 2 8 0 n m の波長で検出した。

10

【 1 1 9 2 】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 3 0 等量 ;

【 1 1 9 3 】

R e t e n s i o n T i m e 1 0 . 5 8 4 2 分はトラスツズマブ原料、1 1 . 6 0 2 4 分はペプチドが 1 個導入された化合物、1 2 . 4 6 1 3 分はペプチドが 2 個導入された化合物であると考えられる ( 図 6 8 )。

20

【 1 1 9 4 】

( 6 0 - 7 ) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 6 0 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 1 1 9 5 】

[ 実施例 6 1 : 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

30

( 6 1 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C R Y H K G Q I I W C T Y H - N H 2 ( 配列番号 7 4 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 4 7 . 8 m g , 2 2 . 0 μ m o l ) を得た。

【 1 1 9 6 】

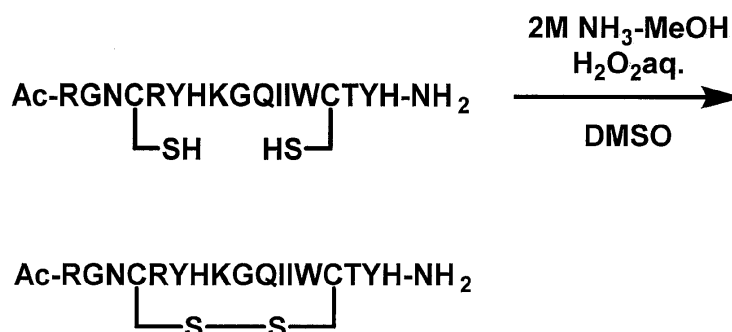
M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 4 5 . 0 0 [ M + 3 H ] 3 +

【 1 1 9 7 】

( 6 1 - 2 ) A c - R G N C R Y H K G Q I I W C T Y H - N H 2 ( 配列番号 7 4 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

40

【 化 1 6 4 】



50



上記アミノ酸配列は、配列番号 74 である。

【1198】

(61-1) で合成したペプチド (47.8 mg, 22.0 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (22.0 μL, 44.0 μmol)、過酸化水素水 (44.9 μL, 440 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (52.5 mg, 24.1 μmol) を得た。

10

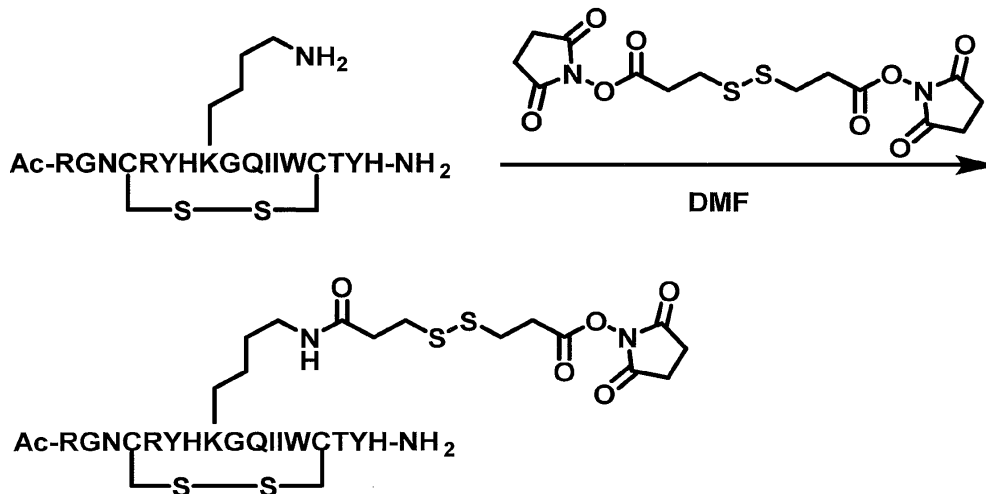
【1199】

MS (ESI) m/z : z = 4 544.65 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1200】

(61-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化165】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号 74 である。

【1201】

(61-2) で合成した Ac-RGNCRYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 74) (52.5 mg, 24.1 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (195 mg, 482 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (20.0 mg, 8.12 μmol) を得た。

40

【1202】

MS (ESI) m/z : z = 4 617.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 74%

【1203】

(61-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

50

(61-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148387にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150730にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153089にピークが確認された。

10

## 【1204】

(61-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(61-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50757に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

## 【1205】

20

(61-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(61-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0, B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

## 【1206】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

30

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

## 【1207】

Retention Time 10.7014分はトラスツズマブ原料、11.4239分はペプチドが1個導入された化合物、12.0250分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図69)。

## 【1208】

(61-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(61-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

40

## 【1209】

[実施例62:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(62-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCVYHKGIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号75)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(71.0mg, 33.5μmol)を得た。

50

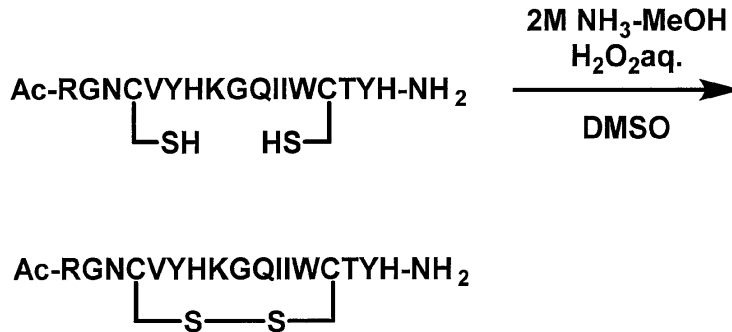
【 1 2 1 0 】

MS (ESI) m/z : z = 4 530.95 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【 1 2 1 1 】

(62-2) Ac-RGNCVYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号75) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化166】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号75である。

【 1 2 1 2 】

(62-1)で合成したペプチド(71.0 mg, 33.5 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(33.5 μL, 67.0 μmol)、過酸化水素水(68.0 μL, 670 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(38.9 mg, 18.4 μmol)を得た。

20

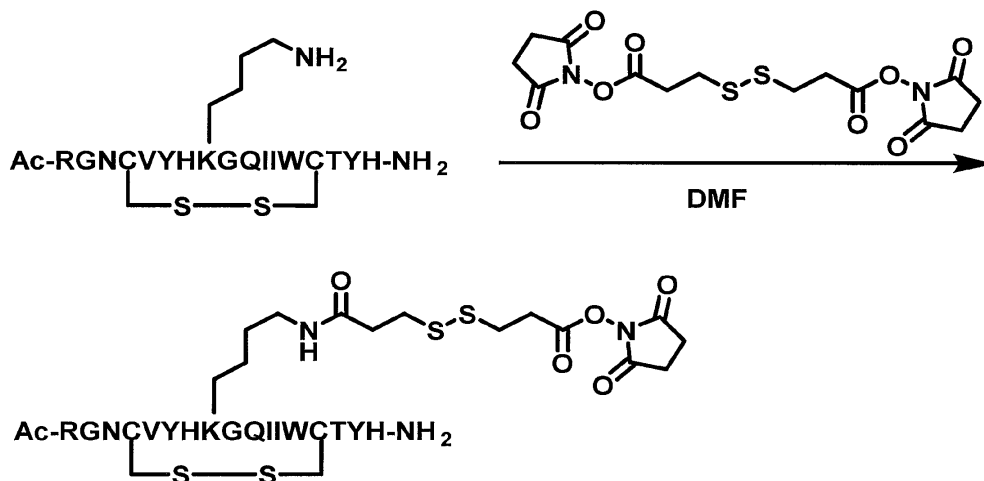
【 1 2 1 3 】

MS (ESI) m/z : z = 4 530.35 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【 1 2 1 4 】

(62-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化167】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号75である。

【 1 2 1 5 】

(62-2)で合成したAc-RGNCVYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号75) (38.9 mg, 18.4 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステイ

50

ンは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(149 mg, 368  $\mu\text{mol}$ )をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(11.2 mg, 4.65  $\text{mol}$ )を得た。

10

【1216】

MS (ESI) m/z : z = 3 803.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 88%

【1217】

(62-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(62-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500  $\mu\text{g}$ を60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9  $\mu\text{L}$ に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$ (抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150358にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152961にピークが確認された。

20

【1218】

(62-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(62-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$ (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50684、50846および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1219】

(62-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(62-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5  $\mu\text{m}$ を使用した。A\_Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B\_Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【1220】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

【1221】

Retention Time 10.9065分はペプチドが1個導入された化合物、11.7157分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図70)。

50

## 【 1 2 2 2 】

( 6 2 - 7 ) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 6 2 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

## 【 1 2 2 3 】

[ 実施例 6 3 : 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

( 6 3 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C N Y H K G Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 7 6 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 1 0 2 m g , 4 7 . 7 μ m o l ) を得た。

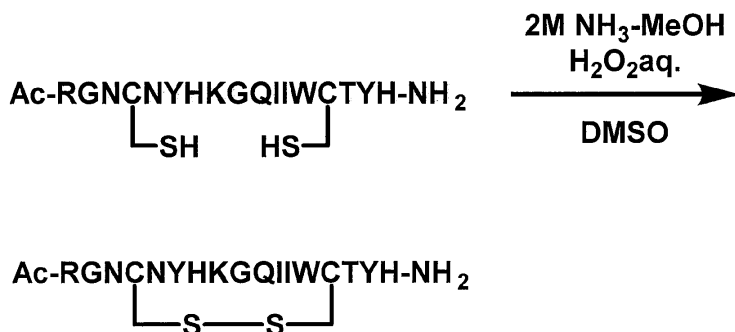
## 【 1 2 2 4 】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 3 4 . 5 5 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

## 【 1 2 2 5 】

( 6 3 - 2 ) A c - R G N C N Y H K G Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 7 6 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

## 【 化 1 6 8 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 7 6 である。

## 【 1 2 2 6 】

( 6 3 - 1 ) で合成したペプチド ( 1 0 2 m g , 4 7 . 7 μ m o l ) を D M S O ( 5 . 0 0 m L ) に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H ( 4 7 . 7 μ L , 9 5 . 4 μ m o l ) 、過酸化水素水 ( 9 7 . 4 μ L , 9 5 4 μ m o l ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 5 1 . 0 m g , 2 3 . 9 μ m o l ) を得た。

## 【 1 2 2 7 】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 3 3 . 9 0 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

## 【 1 2 2 8 】

( 6 3 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

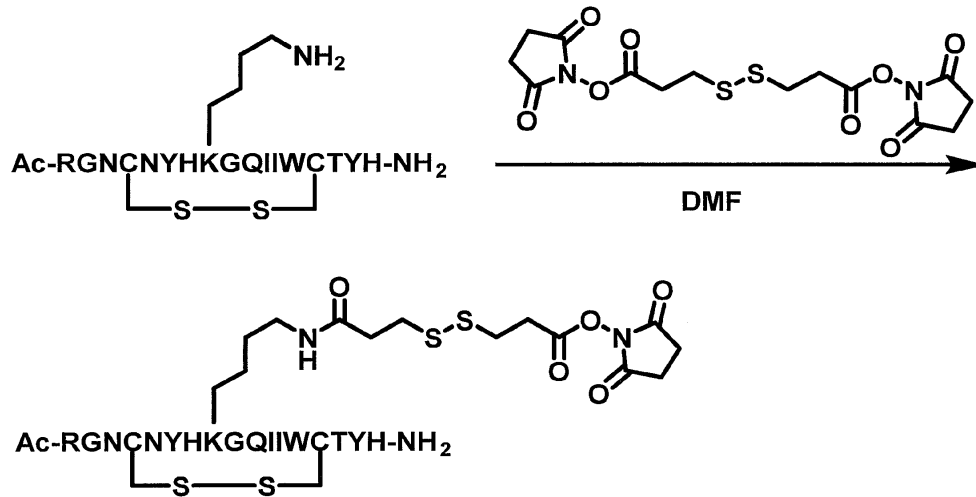
20

30

40

50

【化 1 6 9】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 76 である。

【 1 2 2 9】

(63-2) で合成した Ac-RGNCNYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 76) (51.0 mg, 23.9 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (193 mg, 478 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (19.5 mg, 8.05 mol) を得た。

20

【 1 2 3 0】

MS (ESI) m/z : z = 3 808.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 100%

【 1 2 3 1】

(63-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(63-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150530 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152839 にピークが確認された。

40

【 1 2 3 2】

(63-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(63-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50595、

50

50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1233】

(63-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(63-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

10

【1234】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1235】

Retention Time 10.8348分はペプチドが1個導入された化合物、11.5379分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図71)。

【1236】

(63-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(63-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【1237】

[実施例64: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(64-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

30

Ac-RGNCEYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号77)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(77.7mg, 36.1 μmol)を得た。

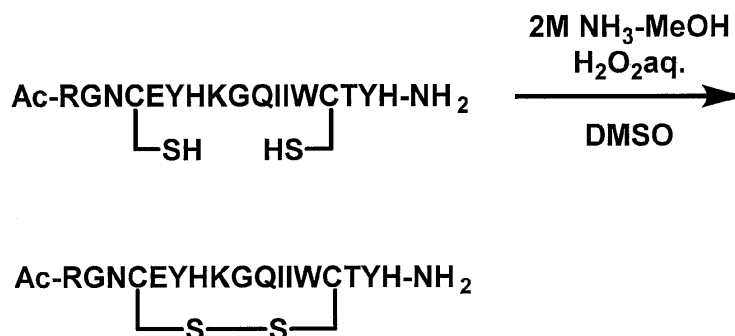
【1238】

MS (ESI) m/z: z = 4 538.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1239】

(64-2) Ac-RGNCEYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号77) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化170】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号77である。

50

## 【1240】

(64-1)で合成したペプチド(77.7 mg, 36.1 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH(36.1 μL, 72.2 μmol)、過酸化水素水(73.7 μL, 722 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(47.5 mg, 22.1 μmol)を得た。

10

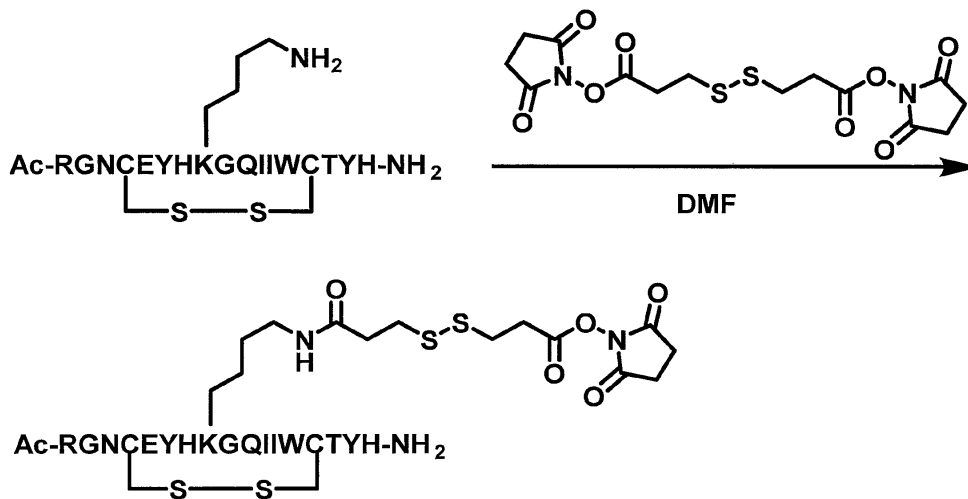
## 【1241】

MS(ESI)m/z: z = 4 537.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>

## 【1242】

(64-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化171】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号77である。

30

## 【1243】

(64-2)で合成したAc-RGNCEYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号77)(47.5 mg, 22.1 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(179 mg, 442 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(20.0 mg, 8.21 mol)を得た。

40

## 【1244】

MS(ESI)m/z: z = 3 813.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 83%

## 【1245】

(64-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(64-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,

50



N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148073にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150667にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153031にピークが確認された。

【1246】

(64-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(64-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1247】

(64-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(64-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【1248】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1249】

Retention Time 10.9760分はペプチドが1個導入された化合物、11.7317分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図72)。

【1250】

(64-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(64-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E NumberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1251】

[実施例65:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(65-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCFYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号78)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(61.9 mg, 28.6 µmol)を得た。

【1252】

MS(ESI)m/z: z = 4 542.85 [M+3H]<sup>3+</sup>

10

20

30

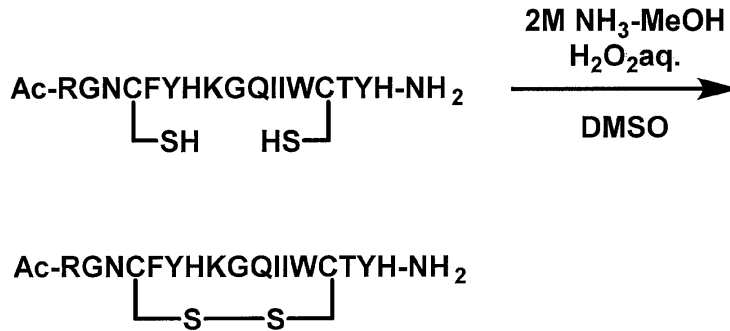
40

50

【 1 2 5 3 】

( 6 5 - 2 ) Ac - R G N C F Y H K G Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 7 8 ) 4 位  
と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 1 7 2 】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 7 8 である。

【 1 2 5 4 】

( 6 5 - 1 ) で合成したペプチド ( 6 1 . 9 m g , 2 8 . 6 μ m o l ) を D M S O ( 5 . 0 0 m L ) に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H ( 2 8 . 6 μ L , 5 7 . 2 μ m o l )、過酸化水素水 ( 5 8 . 4 μ L , 5 7 2 μ m o l ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 3 0 . 2 m g , 1 3 . 9 μ m o l ) を得た。

20

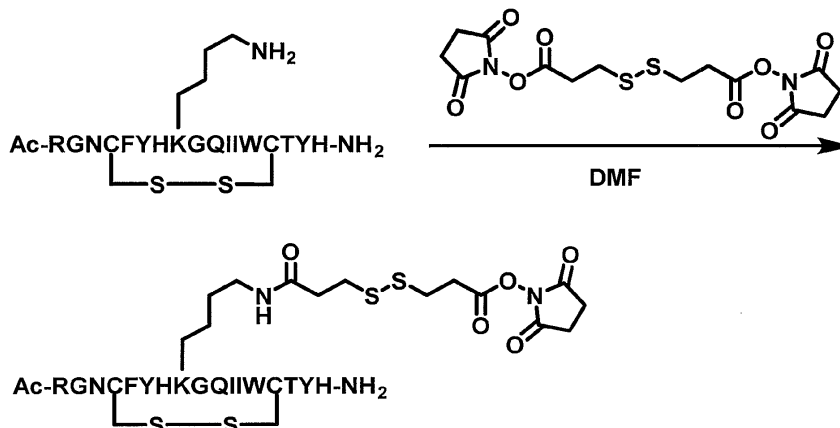
【 1 2 5 5 】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 4 2 . 3 5 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

【 1 2 5 6 】

( 6 5 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【 化 1 7 3 】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号 7 8 である。

【 1 2 5 7 】

( 6 5 - 2 ) で合成した Ac - R G N C F Y H K G Q I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 7 8 ) ( 3 0 . 2 m g , 1 3 . 9 μ m o l 、ただし 4 番目と 1 4 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している ) を N , N - ジメチルホルムアミド ( 0 . 4 0 m L ) に溶解し、3 , 3 ' - ジチオジプロピオン酸ジ ( N - スクシンイミジ ) ( 1 1 2 m g , 2 7 8 μ m o l ) を N , N - ジメチルホルムアミド ( 0 . 6 0 m L ) に溶解した溶液を加え、室温で 2 4 時間攪拌した。これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水

50

溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(12.0mg, 4.89mol)を得た。

【1258】

MS (ESI) m/z : z = 3 819.05 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 78%

【1259】

(65-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(65-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148164にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150725にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153072にピークが確認された。

【1260】

(65-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(65-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50678、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1261】

(65-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(65-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【1262】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1263】

Retention Time 9.9298分はトラスツズマブ原料、10.8757分はペプチドが1個導入された化合物、11.6875分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図73)。

【1264】

(65-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 6 5 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 1 2 6 5 】

[ 実施例 6 6 : 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

( 6 6 - 1 ) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K G E I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 7 9 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 8 2 . 3 m g , 3 9 . 3 μ m o l ) を得た。

【 1 2 6 6 】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 2 3 . 9 0 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

【 1 2 6 7 】

( 6 6 - 2 ) A c - R G N C A Y H K G E I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> ( 配列番号 7 9 ) 4 位と 1 4 位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 1 7 4 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 7 9 である。

【 1 2 6 8 】

( 6 6 - 1 ) で合成したペプチド ( 8 2 . 3 m g , 3 9 . 3 μ m o l ) を D M S O ( 5 . 0 0 m L ) に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H ( 3 9 . 3 μ L , 7 8 . 6 μ m o l ) 、過酸化水素水 ( 8 0 . 3 μ L , 7 8 6 μ m o l ) を加え室温で 2 0 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 0 5 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 0 5 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 4 8 . 7 m g , 2 3 . 3 μ m o l ) を得た。

【 1 2 6 9 】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 2 3 . 6 0 [ M + 3 H ] <sup>3 +</sup>

【 1 2 7 0 】

( 6 6 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

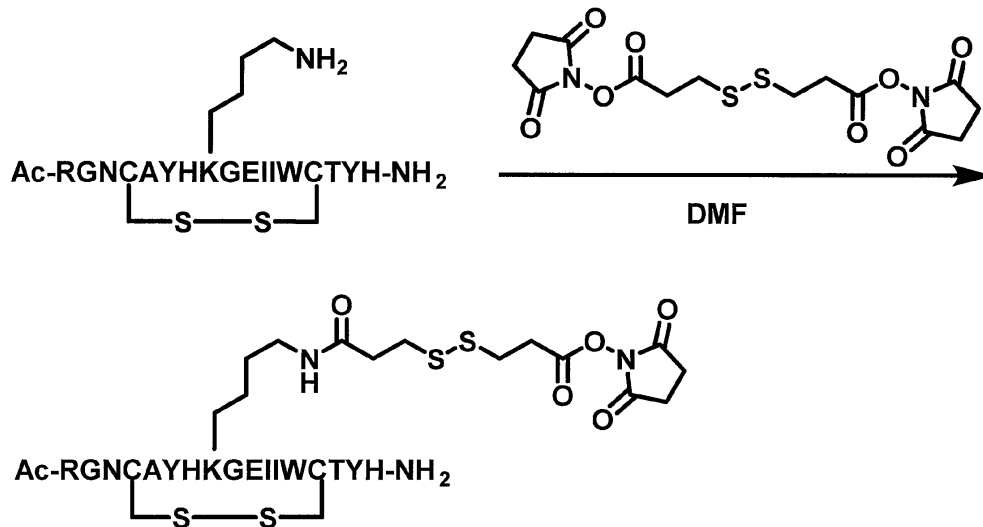
20

30

40

50

## 【化 1 7 5】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 79 である。

## 【 1 2 7 1】

(66-2) で合成した  $\text{Ac-RGNCAYHKGEIIWCTYH-NH}_2$  (配列番号 79) (48.7 mg, 23.3  $\mu\text{mol}$ 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (188 mg, 466  $\mu\text{mol}$ ) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (18.0 mg, 7.56  $\text{mol}$ ) を得た。

20

## 【 1 2 7 2】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  794.10 [M+3H]<sup>3+</sup>  
HPLC 純度: 88%

## 【 1 2 7 3】

(66-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(66-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は  $N,N'$ -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500  $\mu\text{g}$  を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9  $\mu\text{L}$  に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7  $\mu\text{L}$  (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152753 にピークが確認された。

40

## 【 1 2 7 4】

(66-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(66-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5  $\mu\text{L}$  (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50594、

50



## 【1282】

(67-1)で合成したペプチド(85.2 mg, 41.0 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH(41.0 μL, 82.0 μmol)、過酸化水素水(83.8 μL, 820 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(100 mg, 48.2 μmol)を得た。

10

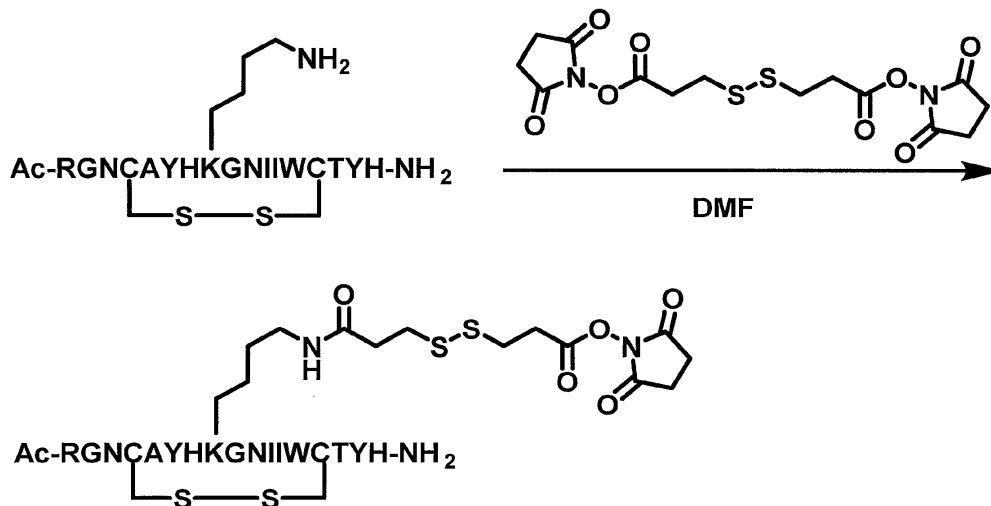
## 【1283】

MS(ESI) m/z: z = 4 519.65 [M + 3H]<sup>3+</sup>

## 【1284】

(67-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化177】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号80である。

30

## 【1285】

(67-2)で合成したAc-RGNCAYHKGNIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号80)(100 mg, 48.2 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(390 mg, 964 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.20 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(18.5 mg, 7.82 μmol)を得た。

40

## 【1286】

MS(ESI) m/z: z = 3 789.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 89%

## 【1287】

(67-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(67-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,

50

N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152886にピークが確認された。

【1288】

(67-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(67-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1289】

(67-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(67-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A\_Buffer:0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer:0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【1290】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1291】

Retention Time 11.5382分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図75)。

【1292】

(67-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(67-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1293】

[実施例68:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(68-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G P I I W C T Y H - NH<sub>2</sub>(配列番号81)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(86.8 mg, 42.1 µmol)を得た。

【1294】

MS(ESI)m/z: z = 4 516.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1295】

(68-2)Ac-RGNCA Y H K G P I I W C T Y H - NH<sub>2</sub>(配列番号81)4位

10

20

30

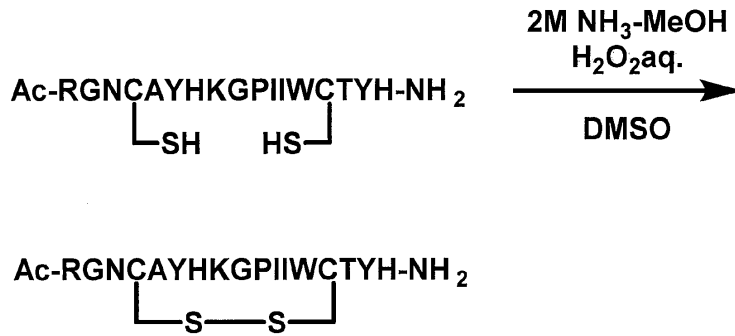
40

50



と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化178】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号81である。

【1296】

(68-1)で合成したペプチド(86.8mg, 42.1 $\mu\text{mol}$ )をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(42.1 $\mu\text{L}$ , 84.2 $\mu\text{mol}$ )、過酸化水素水(86.0 $\mu\text{L}$ , 842 $\mu\text{mol}$ )を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(44.1mg, 21.4 $\mu\text{mol}$ )を得た。

20

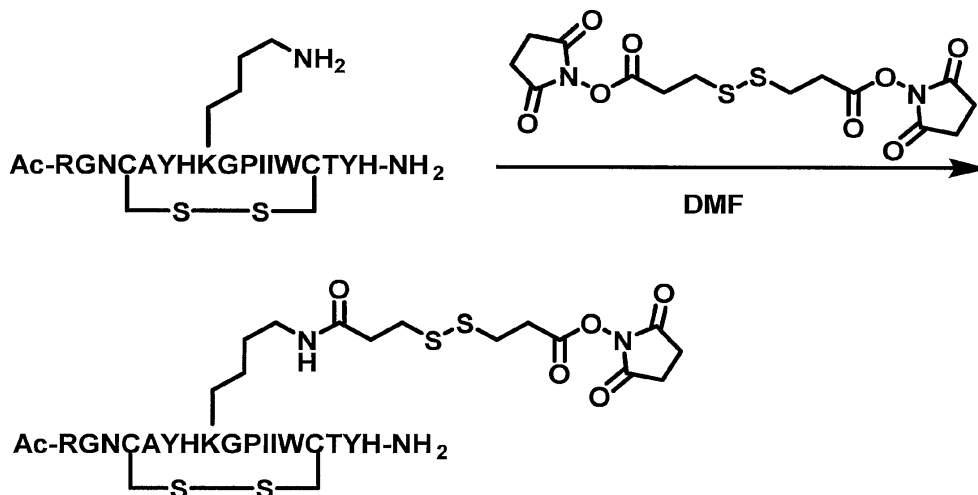
【1297】

MS(ESI)m/z: z = 4 515.55 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1298】

(68-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化179】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号81である。

【1299】

(68-2)で合成したAc-RGNCA $\textbf{YHKGPIIWCTYH-NH}_2$ (配列番号81)(44.1mg, 21.4 $\mu\text{mol}$ 、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(173mg, 428 $\mu\text{mol}$ )をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水

50

溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(12.5mg, 5.32mol)を得た。

【1300】

MS (ESI) m/z : z = 3 783.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 89%

【1301】

(68-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(68-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148394にピークが観測された。

【1302】

(68-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(68-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は原料と同じく50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。

【1303】

(68-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(68-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【1304】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1305】

Retention Time 9.9216分はトラスツズマブ原料であると考えられる(図76)。

【1306】

(68-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(68-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

10

20

30

40

50

## 【1307】

[実施例69：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

## (69-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKGGIIWCTYH-NH<sub>2</sub>（配列番号82）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（68.9 mg, 34.1 μmol）を得た。

## 【1308】

MS (ESI) m/z : z = 4 506.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>

10

## 【1309】

(69-2) Ac-RGNCA YHKGGIIWCTYH-NH<sub>2</sub>（配列番号82）4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化180】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号82である。

## 【1310】

(69-1)で合成したペプチド（68.9 mg, 34.1 μmol）をDMSO（5.00 mL）に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH（34.1 μL, 68.2 μmol）、過酸化水素水（69.7 μL, 682 μmol）を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（34.6 mg, 17.1 μmol）を得た。

30

## 【1311】

MS (ESI) m/z : z = 4 506.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>

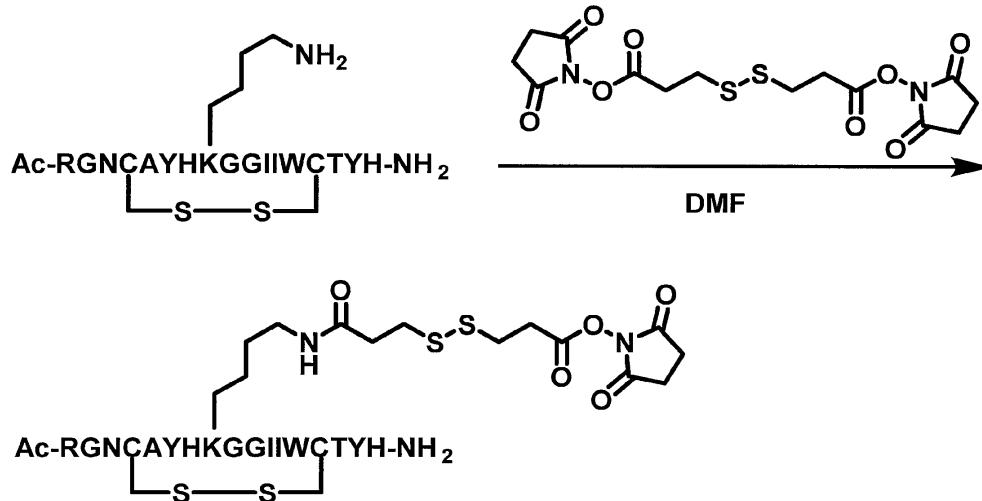
## 【1312】

(69-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

40

50

## 【化 1 8 1】



上記アミノ酸配列は、配列番号 8 2 である。

## 【 1 3 1 3】

(69-2) で合成した Ac-RGNCAYHKGGIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 8 2) (34.6 mg, 17.1 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (138 mg, 342 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (10.5 mg, 4.55 μmol) を得た。

## 【 1 3 1 4】

MS (ESI) m/z : z = 3 770.15 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 91%

## 【 1 3 1 5】

(69-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(69-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150075 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152612 にピークが確認された。

## 【 1 3 1 6】

(69-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(69-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50594、

10

20

30

40

50

50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50683、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1317】

(69-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(69-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【1318】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1319】

Retention Time 11.2073分はペプチドが1個導入された化合物、12.1181分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図77)。

【1320】

(69-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(69-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

20

【1321】

[実施例70: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(70-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

30

Ac-RGNCA Y H K G D I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号83)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(78.1 mg, 37.6 μmol)を得た。

【1322】

MS (ESI) m/z: z = 4 520.65 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1323】

(70-2) Ac-RGNCA Y H K G D I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号83) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化182】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号83である。

50

## 【1324】

(70-1)で合成したペプチド(78.1mg, 37.6 μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(37.6 μL, 75.2 μmol)、過酸化水素水(76.8 μL, 752 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(38.8mg, 18.7 μmol)を得た。

10

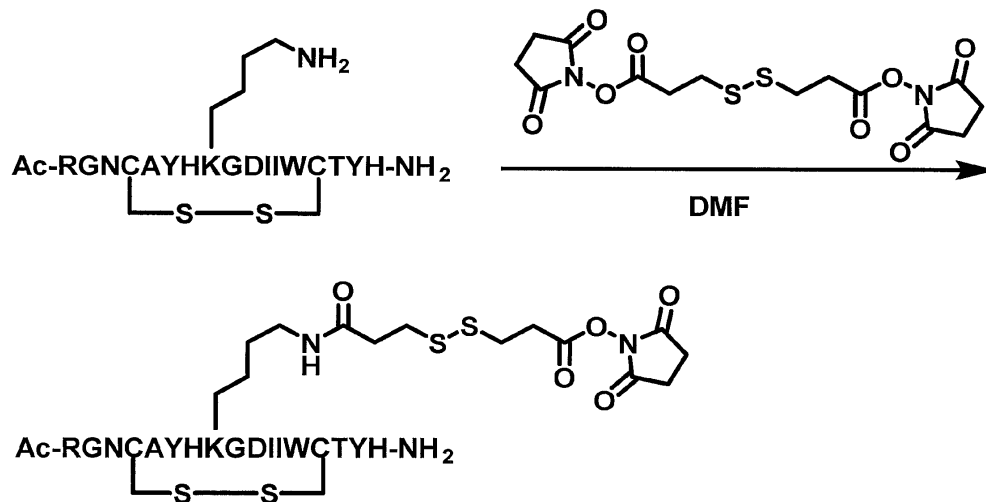
## 【1325】

MS(ESI)m/z: z = 4 520.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

## 【1326】

(70-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

## 【化183】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号83である。

30

## 【1327】

(70-2)で合成したAc-RGNCAYHKGDIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(配列番号83)(38.8mg, 18.7 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(151mg, 374 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(17.5mg, 7.40 μmol)を得た。

40

## 【1328】

MS(ESI)m/z: z = 3 789.60 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度: 88%

## 【1329】

(70-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(70-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,

50

N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファ( pH 4.7 ) 46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30 等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファ( pH 2.9 )に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150682にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153085にピークが確認された。

【1330】

(70-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(70-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1331】

(70-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(70-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

20

【1332】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

30

【1333】

Retention Time 10.5729分はペプチドが1個導入された化合物、11.1577分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図78)。

【1334】

(70-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(70-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1335】

40

[実施例71:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(71-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHKGR I I W C T Y H - NH<sub>2</sub>(配列番号84)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(70.1 mg, 33.1 µmol)を得た。

【1336】

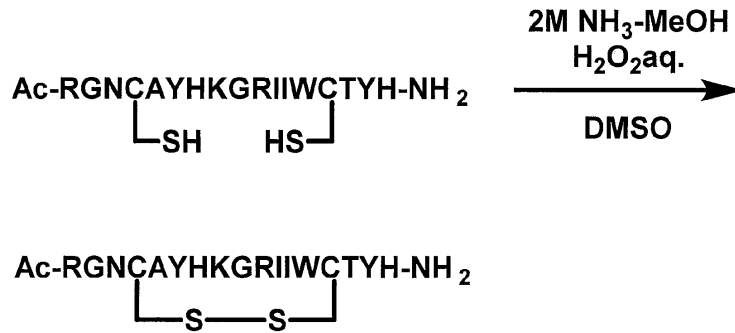
MS(ESI) m/z: z = 4 530.75 [M+3H]<sup>3+</sup>

【1337】

50

(71-2) Ac-RGNCA YHKGR I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号84) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化184】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号84である。

【1338】

(71-1)で合成したペプチド(70.1mg, 33.1μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(33.1μL, 66.2μmol)、過酸化水素水(67.6μL, 662μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(36.8mg, 17.4μmol)を得た。

20

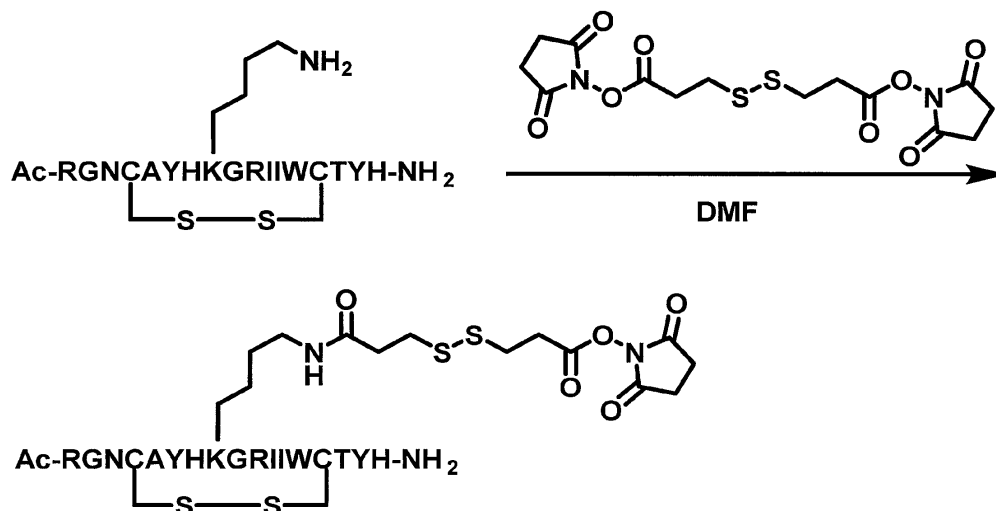
【1339】

MS(ESI)m/z: z = 4 530.40 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1340】

(71-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化185】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号84である。

【1341】

(71-2)で合成したAc-RGNCA YHKGR I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号84)(36.8mg, 17.4μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジ)(141mg, 348μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60mL)

50



に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(6.90mg, 2.87mol)を得た。

【1342】

MS (ESI) m/z : z = 3 803.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 81%

10

【1343】

(71-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(71-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150674にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が153338にピークが確認された。

20

【1344】

(71-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(71-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1345】

(71-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(71-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6×100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

40

【1346】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1347】

Retention Time 10.7319分はペプチドが1個導入された化合物、11.3816分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図79)。

【1348】

(71-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(71-4)で得られた抗体・ペプチド複合

50

体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1349】

[実施例72：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗H E R 2 I g G抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(72-1) I g G 1 F c 結合性ペプチドの合成

A c - R G N C A Y H K G F I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号85)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(61.2 mg, 29.0 μmol)を得た。

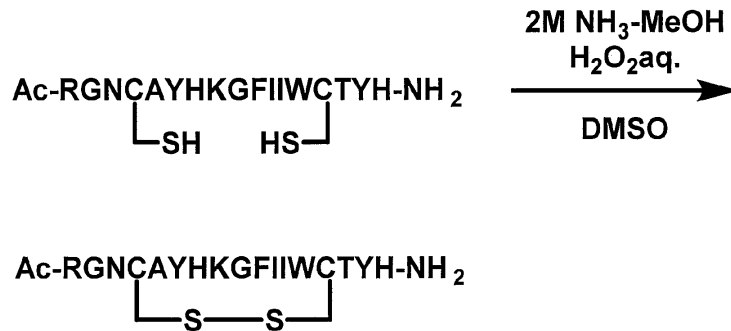
【1350】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 2 8 . 6 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【1351】

(72-2) A c - R G N C A Y H K G F I I W C T Y H - N H <sub>2</sub> (配列番号85)4位と14位のC y sでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化186】



上記アミノ酸配列は、配列番号85である。

【1352】

(72-1)で合成したペプチド(61.2 mg, 29.0 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H (29.0 μL, 58.0 μmol)、過酸化水素水(59.2 μL, 580 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(33.3 mg, 15.8 μmol)を得た。

【1353】

M S ( E S I ) m / z : z = 4 5 2 8 . 0 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【1354】

(72-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

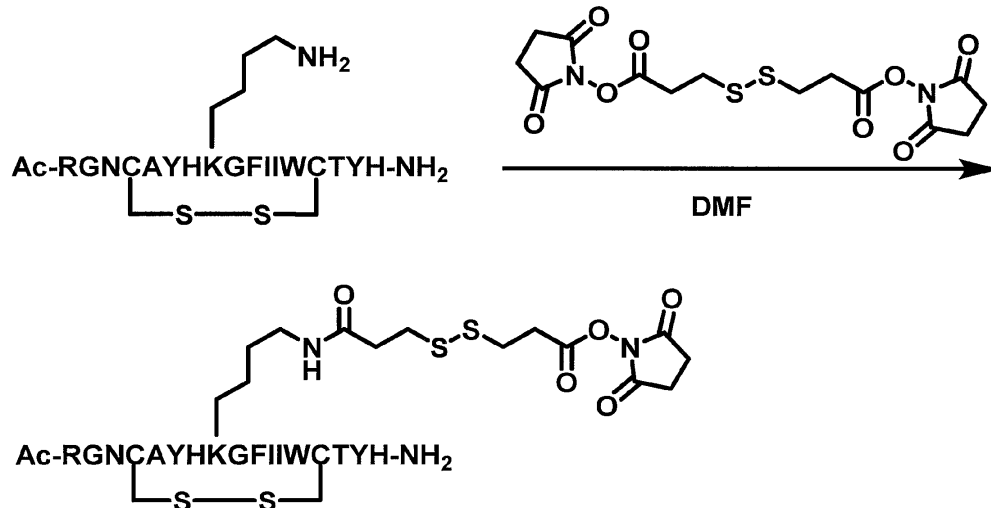
20

30

40

50

【化 1 8 7】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 85 である。

【 1 3 5 5】

(72-2) で合成した Ac-RGNCAYHKGFIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 85) (33.3 mg, 15.8 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (128 mg, 316 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (14.0 mg, 5.84 μmol) を得た。

20

【 1 3 5 6】

MS (ESI) m/z : z = 3 800.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 83%

30

【 1 3 5 7】

(72-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(72-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150706 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152979 にピークが確認された。

40

【 1 3 5 8】

(72-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(72-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50594、

50

50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1359】

(72-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(72-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【1360】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1361】

Retention Time 9.8295分はトラスツズマブ原料、12.2498分はペプチドが1個導入された化合物、13.1829分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図80)。

20

【1362】

(72-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(72-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1363】

[実施例73: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

30

(73-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA Y H K G H I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号86)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(94.0 mg, 44.8 μmol)を得た。

【1364】

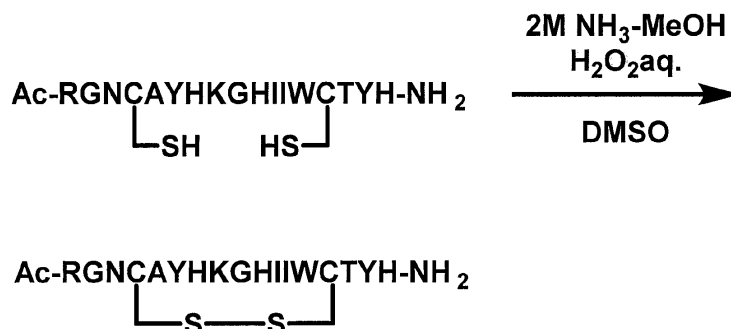
MS (ESI) m/z: z = 4 526.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1365】

(73-2) Ac-RGNCA Y H K G H I I W C T Y H - NH<sub>2</sub> (配列番号86) 4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化188】

40



50

上記アミノ酸配列は、配列番号 86 である。

【1366】

(73-1) で合成したペプチド (94.0 mg, 44.8 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH (44.8 μL, 89.6 μmol)、過酸化水素水 (91.5 μL, 896 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (56.0 mg, 26.7 μmol) を得た。

10

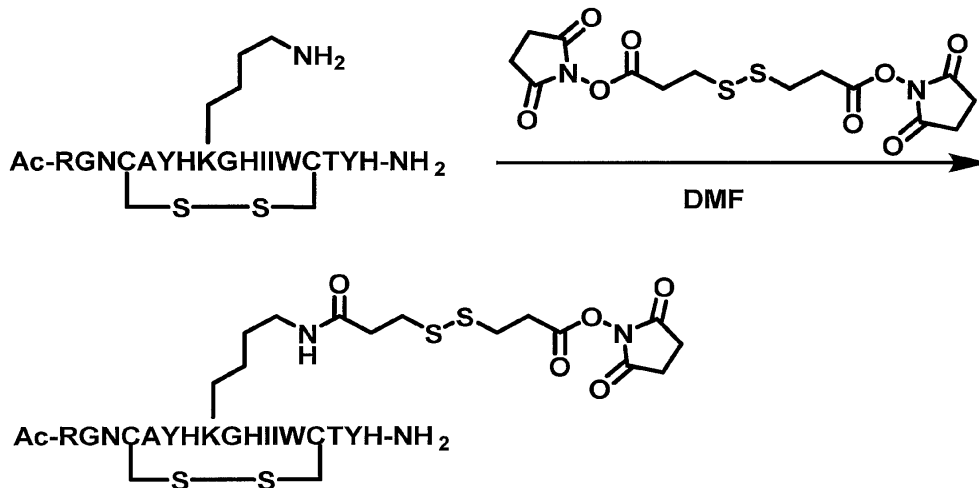
【1367】

MS (ESI) m/z : z = 4 525.70 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1368】

(73-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化189】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号 86 である。

【1369】

(73-2) で合成した Ac-RGNCA YHKGHIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号 86) (56.0 mg, 26.7 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.40 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (216 mg, 534 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (16.8 mg, 7.04 μmol) を得た。

40

【1370】

MS (ESI) m/z : z = 3 796.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 100%

【1371】

(73-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

50

(73-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 $\mu$ gを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 $\mu$ Lに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 $\mu$ L(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150686にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152951にピークが確認された。

【1372】

(73-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(73-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1373】

(73-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(73-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

【1374】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1375】

Retention Time 10.8450分はペプチドが1個導入された化合物、11.5542分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図81)。

【1376】

(73-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(73-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1377】

[実施例74:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(74-1)IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCA Y H K G Q I I W C T - NH<sub>2</sub>(配列番号87)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(66.7mg, 42.2 $\mu$ mol)を得た。

【1378】

MS(ESI)m/z: z = 2 790.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

10

20

30

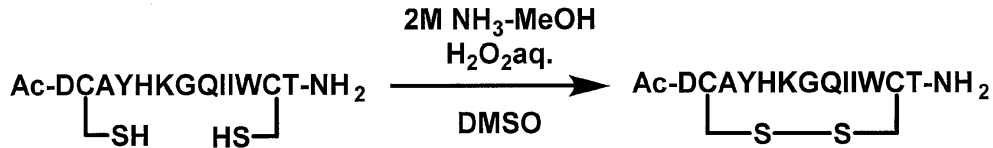
40

50

【1379】

(74-2) Ac-DCA Y H K G Q I I W C T - N H <sub>2</sub> (配列番号87) 2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化190】



上記アミノ酸配列は、配列番号87である。

10

【1380】

(74-1)で合成したペプチド(66.7mg, 42.2μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(42.2μL, 84.4μmol)、過酸化水素水(86.2μL, 844μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(25.0mg, 15.9μmol)を得た。

20

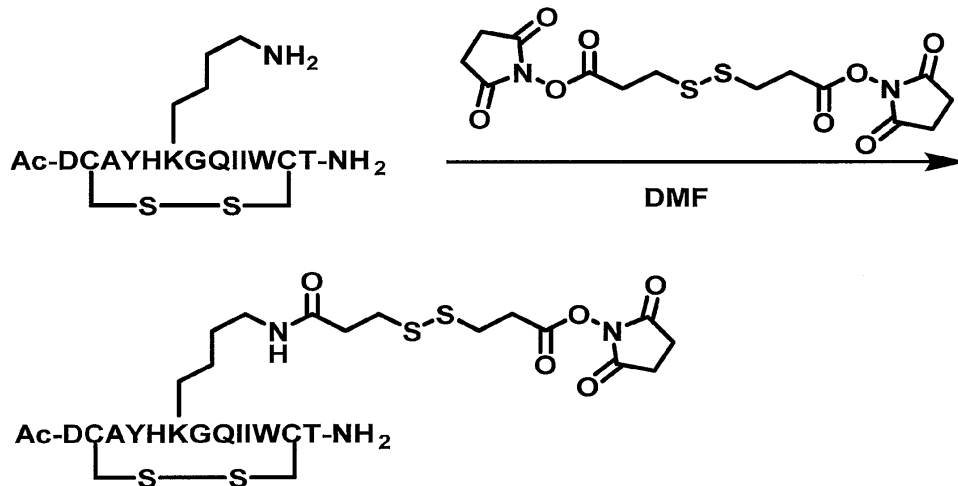
【1381】

MS(ESI)m/z: z = 2 788.95 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1382】

(74-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化191】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号87である。

40

【1383】

(74-2)で合成したAc-DCA Y H K G Q I I W C T - N H <sub>2</sub> (配列番号87)(25.0mg, 15.9μmol、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(129mg, 318μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを

50

回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体 ( 11.0 mg , 5.89 mol ) を得た。

【 1384 】

MS (ESI) m/z : z = 2 933.80 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 92%

【 1385 】

(74-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(74-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬) 500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7) 46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が149462にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152084にピークが確認された。

10

【 1386 】

(74-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(74-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

20

【 1387 】

(74-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(74-5) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0, B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

30

【 1388 】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体 30等量;

40

【 1389 】

Retention Time 12.0543分はペプチドが1個導入された化合物、13.5009分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図82)。

【 1390 】

(74-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(74-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EUnumberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 1391 】

50



[ 実施例 75 : 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 ( ペプチドジスルフィドリンカー-連結物 - NHS 活性化体 ) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析 ]

( 75 - 1 ) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac - NCAYHKGQIIWCT - NH<sub>2</sub> ( 配列番号 88 ) のペプチドを実施例 1 ( 1 - 1 ) と同様の方法で合成、精製を行い、目的物 ( 75 . 1 mg , 47 . 6 μmol ) を得た。

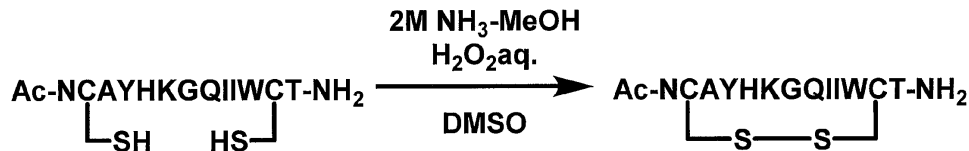
【 1392 】

MS ( ESI ) m / z : z = 2 789 . 65 [ M + 3 H ]<sup>3+</sup>

【 1393 】

( 75 - 2 ) Ac - NCAYHKGQIIWCT - NH<sub>2</sub> ( 配列番号 88 ) 2 位と 12 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

【 化 192 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 88 である。

【 1394 】

( 75 - 1 ) で合成したペプチド ( 75 . 1 mg , 47 . 6 μmol ) を DMSO ( 5 . 00 mL ) に溶解し、2 M NH<sub>3</sub> - MeOH ( 47 . 6 μL , 95 . 2 μmol )、過酸化水素水 ( 97 . 2 μL , 952 μmol ) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0 . 05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0 . 05 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド ( 27 . 7 mg , 17 . 6 μmol ) を得た。

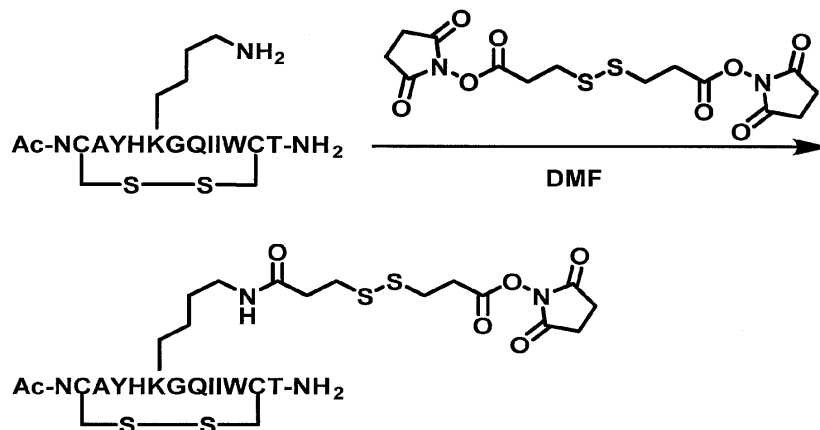
【 1395 】

MS ( ESI ) m / z : z = 2 788 . 90 [ M + 3 H ]<sup>3+</sup>

【 1396 】

( 75 - 3 ) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【 化 193 】



上記アミノ酸配列は、配列番号 88 である。

【 1397 】

( 75 - 2 ) で合成した Ac - NCAYHKGQIIWCT - NH<sub>2</sub> ( 配列番号 88 ) ( 27 . 7 mg , 17 . 6 μmol、ただし 2 番目と 12 番目の 2 つのシステインは、そ

10

20

30

40

50

れぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(142 mg, 352  $\mu\text{mol}$ )をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(10.0 mg, 5.36 mol)を得た。

10

【1398】

MS (ESI) m/z : z = 2 933.10 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 89%

【1399】

(75-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(75-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500  $\mu\text{g}$ を60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9  $\mu\text{L}$ に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu\text{L}$ (抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が149662にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152266にピークが確認された。

20

【1400】

(75-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(75-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu\text{L}$ (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1401】

(75-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(75-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5  $\mu\text{m}$ を使用した。A\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【1402】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1403】

Retention Time 11.8807分はペプチドが1個導入された化合物、13.2467分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図83)。

50

## 【1404】

(75-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(75-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

## 【1405】

[実施例76：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 I g G抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(76-1) I g G 1 F c結合性ペプチドの合成

A c - G N C A Y H K G Q I I W C T Y - N H <sub>2</sub> (配列番号89)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(44.7mg, 24.9μmol)を得た。

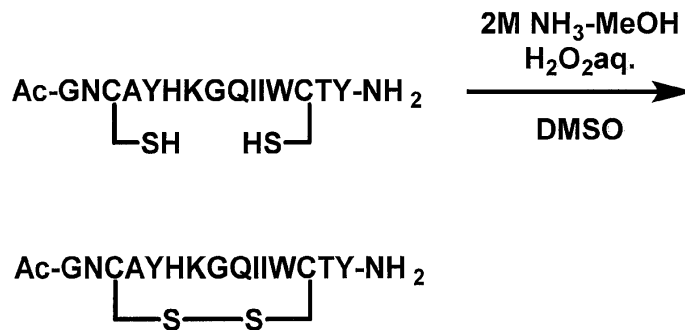
## 【1406】

M S ( E S I ) m / z : z = 2 8 9 9 . 7 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

## 【1407】

(76-2) A c - G N C A Y H K G Q I I W C T Y - N H <sub>2</sub> (配列番号89)3位と13位のC y sでの分子内ジスルフィド結合の形成

## 【化194】



上記アミノ酸配列は、配列番号89である。

## 【1408】

(76-1)で合成したペプチド(44.7mg, 24.9μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(24.9μL, 49.8μmol)、過酸化水素水(50.9μL, 498μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(20.0mg, 11.1μmol)を得た。

## 【1409】

M S ( E S I ) m / z : z = 2 8 9 9 . 0 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

## 【1410】

(76-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

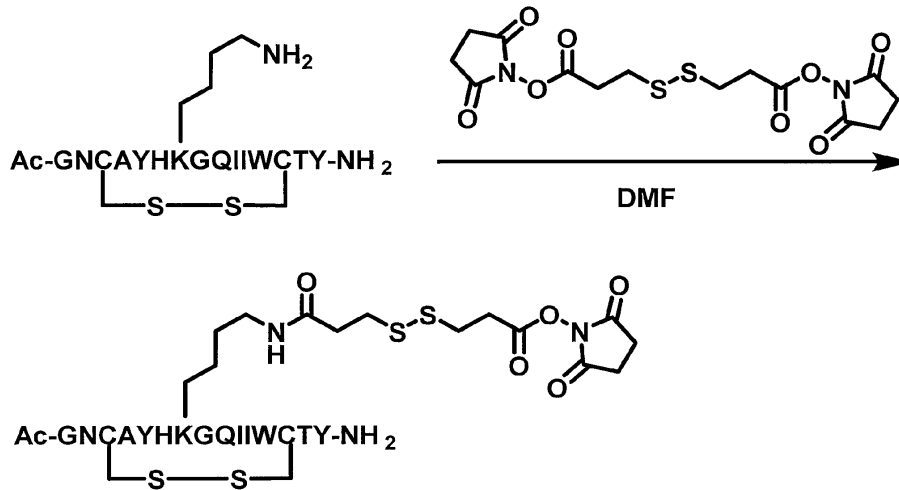
20

30

40

50

【化 1 9 5】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 89 である。

【1411】

(76-2) で合成した Ac-GNCAYHKGQIIWCTY-NH<sub>2</sub> (配列番号 89) (20.0 mg, 11.1 μmol、ただし 3 番目と 13 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.20 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (90 mg, 222 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (9.40 mg, 4.51 mol) を得た。

20

【1412】

MS (ESI) m/z : z = 3 696.00 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 95%

【1413】

(76-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(76-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 152165 にピークが確認された。

40

【1414】

(76-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(76-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50594、50757 に重鎖ピーク、23439 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロ

50

ピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1415】

(76-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(76-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

10

【1416】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1417】

Retention Time 14.1364分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図84)。

【1418】

(76-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

20

実施例3の(3-1)記載の方法により、(76-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1419】

[実施例77: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(77-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-GCAYHKGQIIWCG-NH<sub>2</sub> (配列番号90)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(53.5mg, 36.2 μmol)を得た。

30

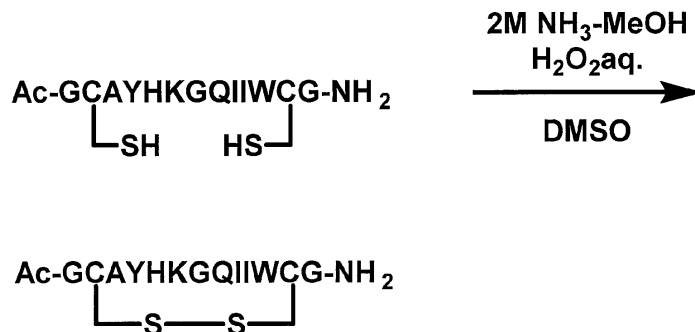
【1420】

MS (ESI) m/z: z = 2 739.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1421】

(77-2) Ac-GCAYHKGQIIWCG-NH<sub>2</sub> (配列番号90) 2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化196】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号90である。

【1422】

50

(77-1)で合成したペプチド(53.5 mg, 36.2 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M NH<sub>3</sub>-MeOH(36.2 μL, 72.4 μmol)、過酸化水素水(74.0 μL, 72.4 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(28.7 mg, 19.5 μmol)を得た。

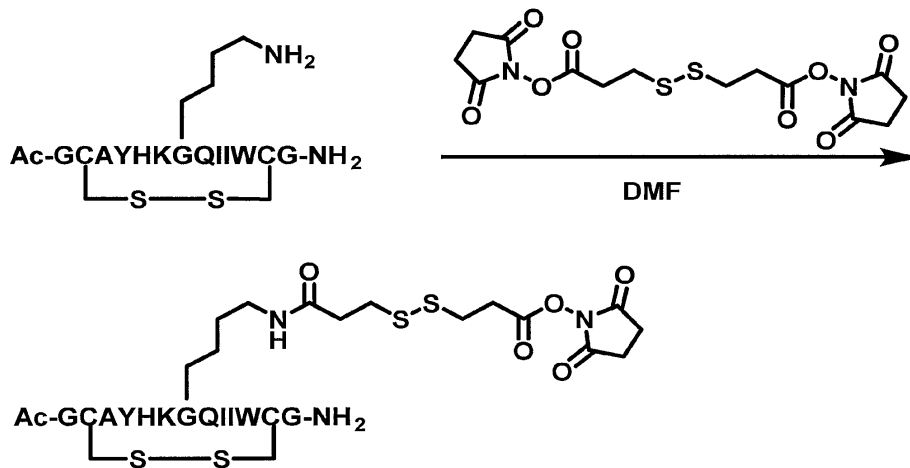
【1423】

MS(ESI) m/z : z = 2 738.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1424】

(77-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化197】



上記アミノ酸配列は、配列番号90である。

【1425】

(77-2)で合成したAc-GCAYHKGQIIWCG-NH<sub>2</sub>(配列番号90)(28.7 mg, 19.5 μmol、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40 mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(158 mg, 390 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.60 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(11.0 mg, 6.24 μmol)を得た。

【1426】

MS(ESI) m/z : z = 2 882.90 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC純度 : 85%

【1427】

(77-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(77-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)

10

20

30

40

50

46.9  $\mu$ Lに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7  $\mu$ L（抗体に対して30等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH 2.9）に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148398にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が149874にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151522にピークが確認された。

【1428】

（77-5）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（77-4）で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mM トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液5  $\mu$ L（抗体に対して等量）を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50757に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1429】

（77-6）抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

（77-4）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column（Waters）4.6 x 100 mm 2.5  $\mu$ mを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min（データ採取20 min）、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【1430】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体 30等量；

【1431】

Retention Time 10.0293分はトラスツズマブ原料、11.9107分はペプチドが1個導入された化合物、13.5054分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる（図85）。

【1432】

（77-7）トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の（3-1）記載の方法により、（77-4）で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1433】

[実施例78: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

（78-1）IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-GGCAYHKGQIIWCGG-NH<sub>2</sub>（配列番号91）のペプチドを実施例1（1-1）と同様の方法で合成、精製を行い、目的物（16.5 mg, 10.4  $\mu$ mol）を得た。

【1434】

MS (ESI) m/z: z = 2 796.20 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1435】

10

20

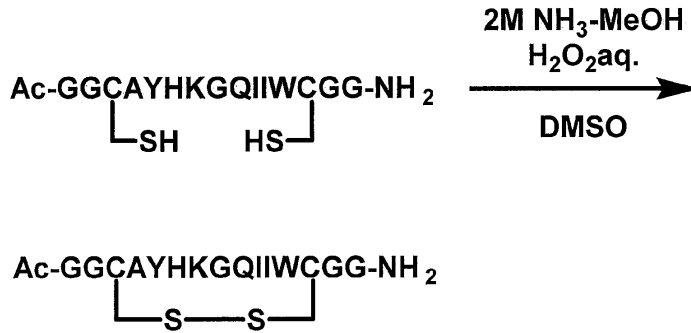
30

40

50

(78-2) Ac-GGCAYHKGQIIWCGG-NH<sub>2</sub> (配列番号91) 3位と13位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化198】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号91である。

【1436】

(78-1)で合成したペプチド(16.5mg, 10.4 μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH<sub>3</sub>-MeOH(10.4 μL, 20.8 μmol)、過酸化水素水(21.2 μL, 208 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(3.70mg, 2.33 μmol)を得た。

20

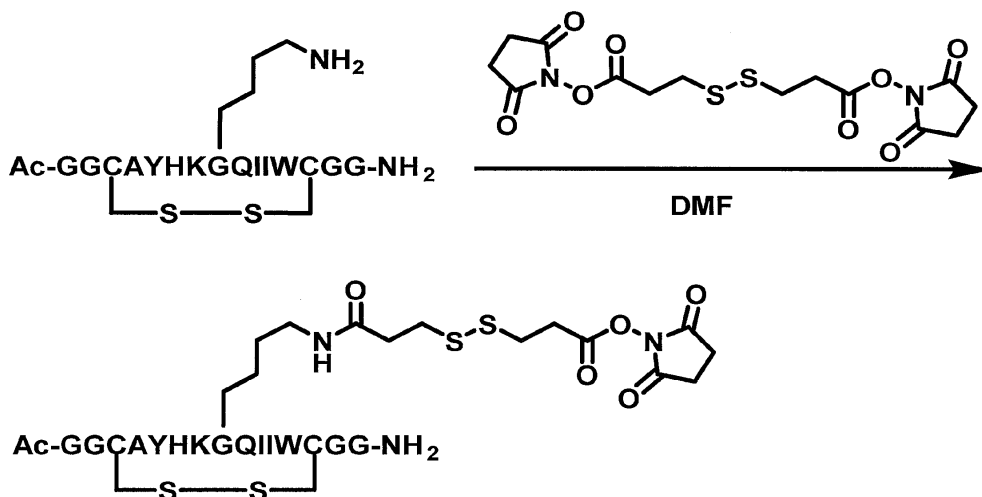
【1437】

MS(ESI)m/z: z = 2 795.35 [M + 3H]<sup>3+</sup>

【1438】

(78-3)ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化199】



30

40

上記アミノ酸配列は、配列番号91である。

【1439】

(78-2)で合成したAc-GGCAYHKGQIIWCGG-NH<sub>2</sub>(配列番号91)(3.70mg, 2.33 μmol、ただし3番目と13番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.40mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシニミジル)(19.0mg, 46.6 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.20mL)

50



に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(1.20mg, 0.64mol)を得た。

【1440】

MS (ESI) m/z : z = 2 939.95 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 60%

10

【1441】

(78-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(78-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148790にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150561にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152305にピークが確認された。

20

【1442】

(78-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(78-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【1443】

(78-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(78-5)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

40

【1444】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量 ;

【1445】

Retention Time 10.2122分はトラスツズマブ原料、11.6858分はペプチドが1個導入された化合物、12.9546分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図86)。

【1446】

50

(78-7) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例3の(3-1)記載の方法により、(78-4)で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n gにおけるL y s 2 4 6およびL y s 2 4 8に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【1447】

[実施例79：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 I g G抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(79-1) I g G 1 F c結合性ペプチドの合成

A c - G G G C A Y H K G Q I I W C G G G - N H <sub>2</sub> (配列番号92)のペプチドを実施例1(1-1)と同様の方法で合成、精製を行い、目的物(69.9 mg, 41.0 μmol)を得た。

【1448】

M S ( E S I ) m / z : z = 2 8 5 3 . 2 5 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【1449】

(79-2) A c - G G G C A Y H K G Q I I W C G G G - N H <sub>2</sub> (配列番号92)4位と14位のC y sでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化200】



上記アミノ酸配列は、配列番号92である。

【1450】

(79-1)で合成したペプチド(69.9 mg, 41.0 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2 M N H <sub>3</sub> - M e O H (41.0 μL, 82.0 μmol)、過酸化水素水(83.8 μL, 820 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2 Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(28.3 mg, 16.6 μmol)を得た。

【1451】

M S ( E S I ) m / z : z = 2 8 5 2 . 3 0 [ M + 3 H ] <sup>3+</sup>

【1452】

(79-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

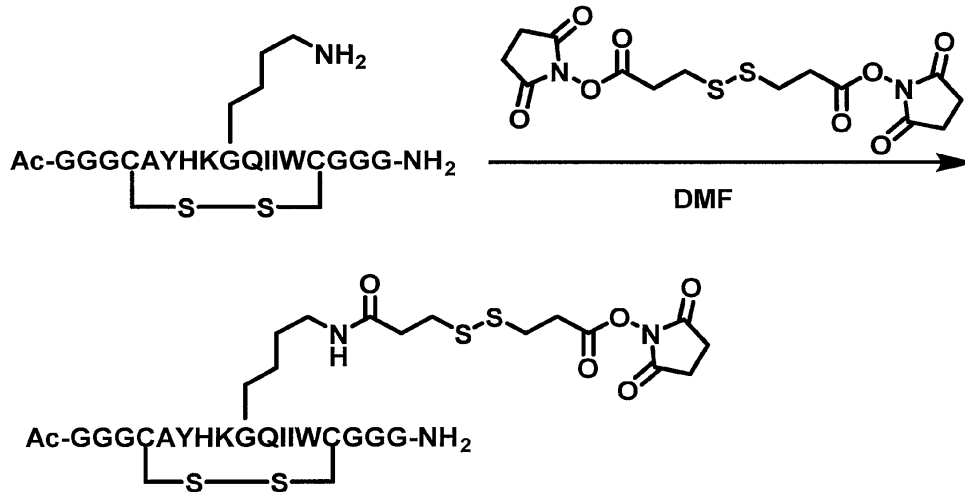
20

30

40

50

【化 2 0 1】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 9 2 である。

【 1 4 5 3】

(79-2) で合成した Ac - G G G C A Y H K G Q I I W C G G G - N H <sub>2</sub> (配列番号 9 2) (28.3 mg, 16.6 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N - ジメチルホルムアミド (0.80 mL) に溶解し、3, 3' - ジチオジプロピオン酸ジ (N - スクシンイミジル) (134 mg, 332 μmol) を N, N - ジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC - MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS 活性化体 (2.00 mg, 1.00 μmol) を得た。

20

【 1 4 5 4】

MS (ESI) m/z : z = 3 664.75 [M + 3H]<sup>3+</sup>

HPLC 純度 : 62%

30

【 1 4 5 5】

(79-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI - TOFMS による解析

(79-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物 - NHS 活性化体は N, N' - ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI - TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148225 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150102 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 151977 にピークが確認された。

40

【 1 4 5 6】

(79-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI - TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(79-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。

50

E S I - T O F M S により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 5 0 5 9 5、5 0 7 5 7 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 5 0 6 8 2、5 0 8 4 4 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

【 1 4 5 7 】

( 7 9 - 6 ) 抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブの特異的修飾の H I C - U P L C 解析 ( 7 9 - 4 ) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を H I C により解析した。カラムは P r o t e i n - P a k H i R e s H I C C o l u m n ( W a t e r s ) 4 . 6 x 1 0 0 m m 2 . 5 μ m を使用した。A \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , 2 . 3 M ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> , p H 7 . 0、B \_ B u f f e r : 0 . 1 M P i N a , p H 7 . 0 にて流速は 0 . 6 m l / m i n、グラジエントを A 6 0 % B 4 0 % A 0 % B 1 0 0 % , 1 6 m i n ( データ採取 2 0 m i n )、カラム温度は 4 0、サーモスタット温度は 4 0、検出器は 2 8 0 n m の波長で検出した。

10

【 1 4 5 8 】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ + ペプチドジスルフィドリンカー連結物 - N H S 活性化体 3 0 等量 ;

【 1 4 5 9 】

R e t e n s i o n T i m e 1 0 . 0 5 9 9 分はトラスツズマブ原料、1 1 . 3 7 9 4 分はペプチドが 1 個導入された化合物、1 2 . 4 8 0 4 分はペプチドが 2 個導入された化合物であると考えられる ( 図 8 7 )。

20

【 1 4 6 0 】

( 7 9 - 7 ) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化

実施例 3 の ( 3 - 1 ) 記載の方法により、( 7 9 - 4 ) で得られた抗体・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化を行えば、E U n u m b e r i n g における L y s 2 4 6 および L y s 2 4 8 に位置選択的にチオプロピオニル基が導入された抗体を得ることが可能である。

【 1 4 6 1 】

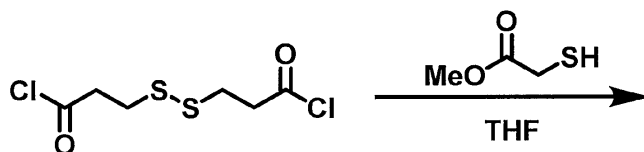
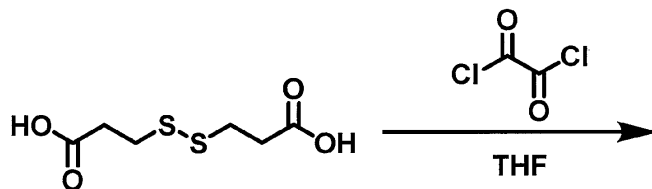
[ 実施例 8 0 : 切断性リンカーの合成と I g G 1 F c 結合性ペプチドとの連結 ]

( 8 0 ) 切断性リンカーの合成とペプチドとの連結

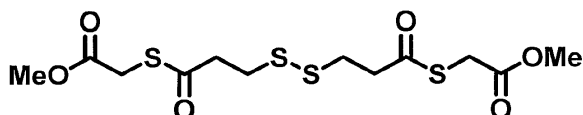
( 8 0 - 1 ) チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

( 8 0 - 1 - 1 ) チオエステルリンカーの合成

【 化 2 0 2 】



40



【 1 4 6 2 】

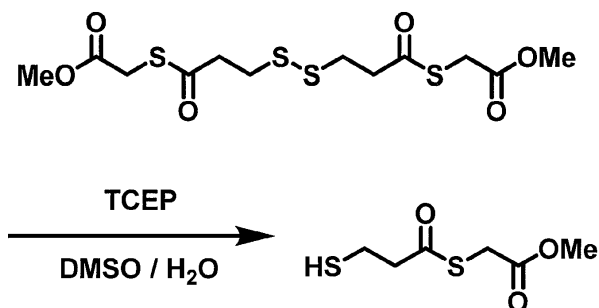
50

3, 3'-ジチオプロピオン酸 (1.0 g, 5.0 mmol) を THF 10 mL、DMF 100  $\mu$ L に溶解させ、ピリジン (4.0 mL, 50 mmol) とオキサリクロライド (1.5 mL, 15.0 mmol) を氷冷下滴下し、2時間室温にて攪拌した。2時間後、メチルチオグリコレート (1.1 mL, 15.0 mmol) を滴下し、さらに室温で2時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、ヘキサン/酢酸エチルの順相クロマトグラフィーにより精製することで目的とするメチル 2-[3-[ [3-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)スルファニル-3-オキソ-プロピル]ジスルファニル]プロパノイルスルファニル]アセテート (1.74 g, 4.5 mmol) を得た。

【1463】

MS (ESI) m/z : 387.0 [M+H]<sup>+</sup>

【化203】



10

20

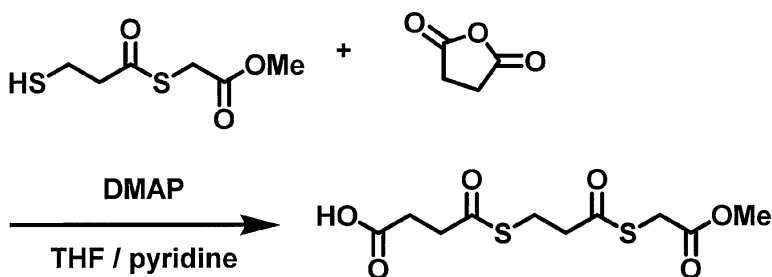
【1464】

メチル 2-[3-[ [3-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)スルファニル-3-オキソ-プロピル]ジスルファニル]プロパノイルスルファニル]アセテート (1.74 g, 4.5 mmol) を H<sub>2</sub>O 5.0 mL、DMSO 1.0 mL に溶解させ、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (1.93 g, 6.75 mmol) を加え2時間室温にて攪拌した。2時間後、酢酸エチルにより抽出することで、目的とするメチル 2-(3-スルファニルプロパノイルスルファニル)アセテート (1.20 g, 6.2 mmol) を得た。

【1465】

MS (ESI) m/z : 195.0 [M+H]<sup>+</sup>

【化204】



30

【1466】

メチル 2-(3-スルファニルプロパノイルスルファニル)アセテート (1.20 g, 6.2 mmol) にアセトニトリル 2.7 mL、ピリジン 0.3 mL を加え溶解した。その後、無水コハク酸 (0.65 g, 6.5 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (12.2 mg, 0.1 mmol) を加え1時間攪拌した。1M塩酸水溶液 20 mL を加え、酢酸エチルにより抽出した。減圧濃縮することで、4-[3-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)スルファニル-3-オキソ-プロピル]スルファニル-4-オキソ-ブタン酸 (1.18 g, 4.0 mmol) を得た。

40

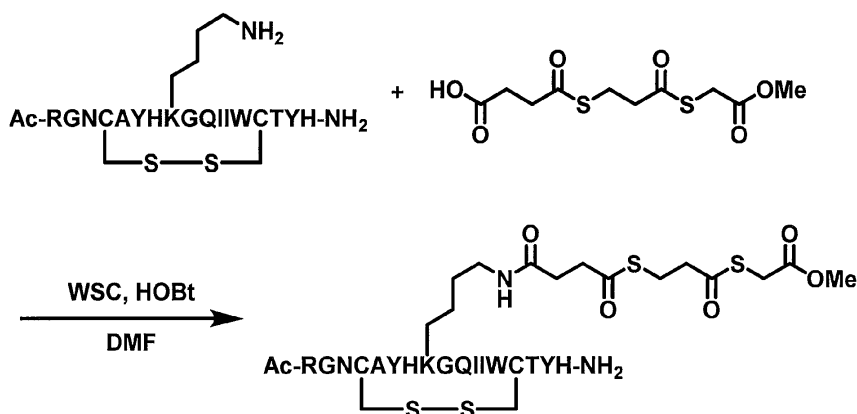
【1467】

MS (ESI) m/z : 295.0 [M+H]<sup>+</sup>

【1468】

50

(80-1-2) チオエステルリンカーとペプチドの連結  
【化205】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号5である。

【1469】

(80-1)で合成したAc-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号5) (30 mg, 14.4 μmol、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。)をN,N'-ジメチルホルムアミド1 mLに溶解し、4-[3-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)スルファニル-3-オキソ-プロピル]スルファニル-4-オキソ-ブタン酸(65 mg, 0.22 mmol), WSC・HCl(41 mg, 0.22 mmol)を加えた。室温で12時間攪拌した後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体(24.1 mg, 10.2 μmol)を得た。

20

【1470】

MS (ESI) m/z : z = 3 789 [M + 3H]<sup>3+</sup>, z = 4 592 [M + 4H]<sup>4+</sup>

【1471】

(80-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

30

(80-3)で合成したペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを50 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。

【1472】

(80-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

40

(80-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にペプチド-リンカー連結物が導入された52855、53017および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図88)。

【1473】

(80-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(80-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

50

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

## 【1474】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラストズマブ原料

b: トラストズマブ+ペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体10等量;

10

## 【1475】

Retention Time 10.6216分はペプチドが1個導入された化合物、11.1941分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図89)。

## 【1476】

(80-7) トラストズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断

(80-4)で得られたトラストズマブ・ペプチド複合体(20mM PBSバッファ)をAmicon 3Kにより、0.5Mヒドロキシルアミン、10mM EDTA (pH5.5)溶液へと置換し、室温で2時間静置した。2時間後、20mM PBSバッファ、10mM EDTA (pH7.4)へと置換し、トラストズマブ・チオール導入体を得た。

20

## 【1477】

(80-8) トラストズマブ・チオール導入体の特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(80-7)で生成したトラストズマブ・チオール導入体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラストズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図90)。

## 【1478】

(80-9) 抗HER2 IgG抗体トラストズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(80-4)で生成したトラストズマブ・チオール導入体とトラストズマブ・ペプチド複合体の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%, 16min (データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

30

## 【1479】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラストズマブ・ペプチド複合体

b: トラストズマブ・チオール導入体;

40

## 【1480】

Retention Time 10.2950分はチオプロピオニル基が2個導入された化合物であると考えられる(図91)。

## 【1481】

(80-10) トラストズマブ・チオール導入体への蛍光標識

(80-7)で得られたトラストズマブ・チオール導入体(20mM PBSバッファ、10mM EDTA)に対して、フルオレセイン-5-マレイミド(10mM、DMSOに溶解)を5等量加えた。室温にて1時間静置後、20mM PBSバッファに置換し

50

、トラスツズマブ蛍光標識体 (ADC mimic) を得た。

【1482】

(80-11) トラスツズマブ蛍光標識体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(80-10) で生成したトラスツズマブ蛍光標識体 (ADC mimic) に7mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L (抗体に対して等量) を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ・チオール導入体は50682、50844に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にフルオレセインが導入された51110、51272および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図92)。

10

【1483】

(80-12) トラスツズマブ・チオール導入体からのクリック反応を利用したADC mimicの合成

(80-7) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体(20mM PBSバッファ、10mM EDTA) に対して、N-(4-アジドフェニル)-2-ヨード-アセトアミド(10mM、DMSOに溶解) を10等量加えた。室温にて1時間静置後、20mM PBSバッファに置換し、ジベンゾシクロオクチン酸(DBCO-Acid、10mM、DMSOに溶解) を5等量加えてクリック反応を行い、ADC mimicを得た。

【1484】

(80-13) ADC mimicの還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

20

(80-12) で生成したADC mimicに7mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L (抗体に対して等量) を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ・チオール導入体は50682、50844に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にクリック反応生成物が導入された51176、51338および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図93)。

【1485】

(80-14) まとめ

トラスツズマブ、(80-5)、(80-8)、(80-10)、(80-12)の結果をまとめる(図94)。

30

【1486】

[実施例81: 切断性リンカーの合成とIgG1 Fc結合性ペプチドとの連結]

(81) 切断性リンカーの合成とペプチドとの連結

(81-1) チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

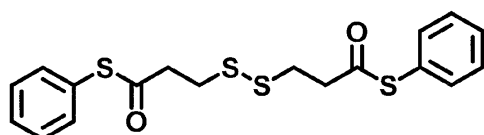
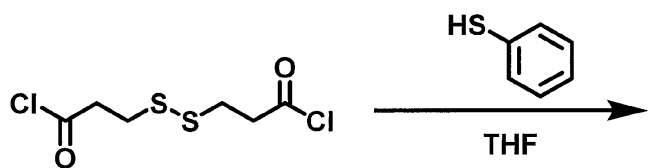
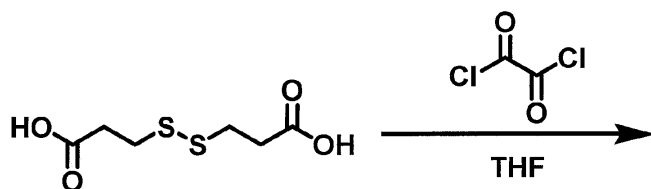
(81-1-1) チオエステルリンカーの合成

40

50



【化206】



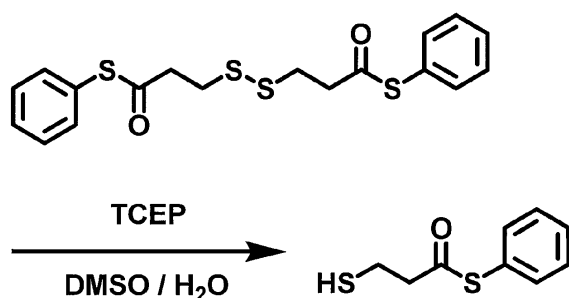
【1487】

3,3'-ジチオプロピオン酸 (1.0 g, 5.0 mmol) を THF 10 mL、DMF 100  $\mu$ L に溶解させ、ピリジン (4.0 mL, 50 mmol) とオキサリルクロライド (1.5 mL, 15.0 mmol) を氷冷下滴下し、2時間室温にて攪拌した。2時間後、チオフェノール (1.53 mL, 15.0 mmol) を滴下し、さらに室温で2時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、ヘキサン/酢酸エチルの順相クロマトグラフィーにより精製することで目的とする S-フェニル 3-[(3-オキソ-3-フェニルスルファニル-プロピル)ジスルファニル]プロパンチオエート (1.77 g, 4.5 mmol) を得た。

【1488】

MS (ESI) m/z : 395.1 [M+H]<sup>+</sup>

【化207】



【1489】

S-フェニル 3-[(3-オキソ-3-フェニルスルファニル-プロピル)ジスルファニル]プロパンチオエート (1.77 g, 4.5 mmol) を H<sub>2</sub>O 5.0 mL、DMSO 1.0 mL に溶解させ、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (1.93 g, 6.75 mmol) を加え2時間室温にて攪拌した。2時間後、酢酸エチルにより抽出することで、目的とする S-フェニル 3-スルファニルプロパンチオエート (1.29 g, 6.5 mmol) を得た。

【1490】

MS (ESI) m/z : 199.2 [M+H]<sup>+</sup>

10

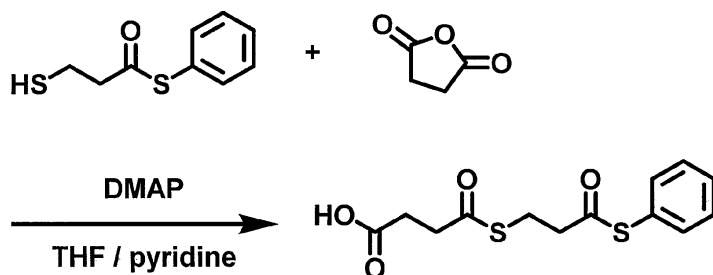
20

30

40

50

【化208】



【1491】

S-フェニル 3-スルファニルプロパンチオエート (1.29 g, 6.5 mmol) にアセトニトリル 2.7 mL, ピリジン 0.3 mL を加え溶解した。その後、無水コハク酸 (0.65 g, 6.5 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (12.2 mg, 0.1 mmol) を加え1時間攪拌した。1 M 塩酸水溶液 20 mL を加え、酢酸エチルにより抽出した。減圧濃縮することで、(4-オキソ-4-(3-オキソ-3-フェニルスルファニル-プロピル)スルファニル-ブタン酸 (1.25 g, 4.2 mmol) を得た。

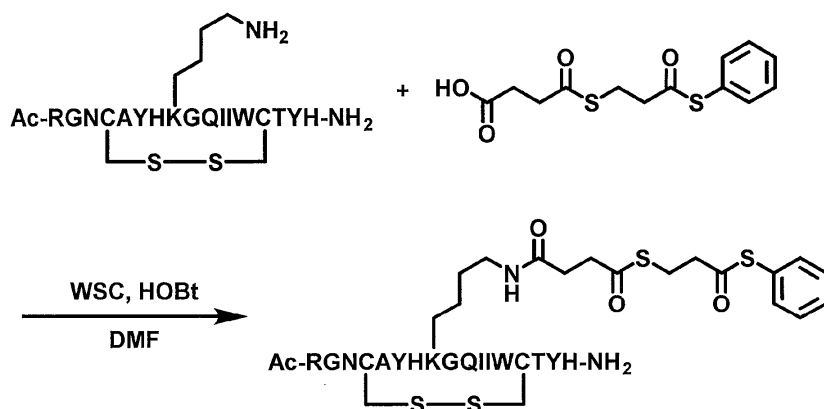
【1492】

MS (ESI)  $m/z$ : 299.0 [M+H]<sup>+</sup>

【1493】

(81-1-2) チオエステルリンカーとペプチドの連結

【化209】



上記アミノ酸配列は、配列番号5である。

【1494】

(81-1) で合成した Ac-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号5) (30 mg, 14.4 μmol、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。) を N,N'-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解し、(4-オキソ-4-(3-オキソ-3-フェニルスルファニル-プロピル)スルファニル-ブタン酸 (64 mg, 0.22 mmol), WSC·HCl (41 mg, 0.22 mmol) を加えた。室温で12時間攪拌した後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体 (22.3 mg, 9.4 μmol) を得た。

【1495】

MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 3$  790 [M+3H]<sup>3+</sup>,  $z = 4$  593 [M+4H]<sup>4+</sup>

【1496】

(81-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

10

20

30

40

50

(81-3)で合成したペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。

【1497】

(81-5)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(81-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にペプチド-リンカー連結物が導入された52855、53017および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1498】

(81-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(81-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%、16 min(データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

20

【1499】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体30等量;

【1500】

Retention Time 10.5580分はペプチドが1個導入された化合物、11.1331分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図95)。

30

【1501】

(81-7)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断

(81-4)で得られたトラスツズマブ・ペプチド複合体(20 mM PBSバッファー)をAmicon 3Kにより、0.5 Mヒドロキシルアミン、10 mM EDTA(pH 5.5)溶液へと置換し、室温で2時間静置した。2時間後、20 mM PBSバッファー、10 mM EDTA(pH 7.4)へと置換し、トラスツズマブ・チオール導入体を得た。

【1502】

(81-8)トラスツズマブ・チオール導入体の特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

40

(81-7)で生成したトラスツズマブ・チオール導入体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【1503】

(81-9)One-pot法によるトラスツズマブ・チオール導入体の合成

50

( 8 1 - 3 ) で合成したペプチド - リンカー連結物 - チオフェノール活性化体は N , N ' - ジメチルホルムアミドに溶解し 2 1 . 6 m M とした。抗 H E R 2 I g G 抗体トラスツズマブ ( 中外製薬 ) 5 0 0 μ g を 6 0 m M 酢酸ナトリウムバッファー ( p H 5 . 5 ) 4 6 . 9 μ L に溶解させ、 2 1 . 6 m M のペプチド試薬を 4 . 7 μ L ( 抗体に対して 3 0 等量 ) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。その後、 0 . 5 M ヒドロキシルアミン、 1 0 m M E D T A ( p H 5 . 5 ) 溶液を酢酸ナトリウムと同量添加し、室温で 2 時間静置した。 2 時間後、 2 0 m M P B S バッファー、 1 0 m M E D T A ( p H 7 . 4 ) へと置換し、トラスツズマブ・チオール導入体を得た。

#### 【 1 5 0 4 】

( 8 1 - 1 0 ) トラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

10

( 8 1 - 9 ) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体を P N G a s e F ( N e w E n g l a n d B i o L a b s 社製 ) により糖鎖切断を行った後、ペプチドマッピングを行った。 1 . 5 m L 低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を 1 0 μ L 、 5 0 m M 炭酸水素アンモニウム緩衝液、 4 0 % トリフルオロエタノールに溶解した 2 0 m M のジチオスレイトール水溶液 1 0 μ L を加えて 6 5 ° C で 1 時間加熱後、 5 0 m M のヨードアセトアミド水溶液 1 0 μ L を添加し、遮光下室温で 3 0 分間反応させた。反応後、 5 0 m M 炭酸水素アンモニウム緩衝液を 4 0 μ L 加えて攪拌し、 2 0 n g / μ L のトリプシン水溶液を 1 0 μ L 添加して 3 7 ° C で 1 6 時間酵素消化した。消化後、 2 0 % トリフルオロ酢酸水溶液を 2 μ L 添加し反応を止め、 L C - M S / M S 測定を実施した。

#### 【 1 5 0 5 】

20

( 8 1 - 1 1 ) トリプシン消化物の L C - M S / M S 測定条件

( 分析装置 )

ナノ H P L C : E A S Y - n L C 1 0 0 0 ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 )

質量分析計 : トライブリッド質量分析計 O r b i t r a p F u s i o n ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 )

#### 【 1 5 0 6 】

( H P L C 分析条件 )

トラップカラム : A c c l a i m P e p M a p ( 登録商標 ) 1 0 0 , 7 5 μ m × 2 c m ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 )

30

分析カラム : E S I - c o l u m n ( N T C C - 3 6 0 / 7 5 - 3 - 1 2 5 , 7 5 μ m × 1 2 . 5 c m , 3 μ m ( 日京テクノス株式会社 ) )

移動相 A : 0 . 1 % ギ酸水溶液

移動相 B : 0 . 1 % ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液 : 0 . 1 % トリフルオロ酢酸水溶液

流速 : 3 0 0 n L / m i n

サンプル注入量 : 1 μ L

グラジエント条件 ( B % ) : 2 % ( 0 . 0 - 0 . 5 分 ) 、 2 % → 3 0 % ( 0 . 5 - 2 3 . 5 分 ) 、 3 0 % → 7 5 % ( 2 3 . 5 - 2 5 . 5 分 ) 、 7 5 % ( 2 5 . 5 - 3 5 . 0 分 )

#### 【 1 5 0 7 】

40

( 質量分析計分析条件 )

イオン化法 : E S I , P o s i t i v e モード

スキャンタイプ : D a t a D e p e n d e n t A q u i s i t i o n

A c t i v a t i o n T y p e : C o l l i s i o n I n d u c e d D i s s o c i a t i o n ( C I D )

データの取得は付属ソフトである X c a l i b u r 3 . 0 ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) および T h e r m o O r b i t r a p F u s i o n T u n e A p p l i c a t i o n 2 . 0 ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) を用いて行った。

#### 【 1 5 0 8 】

50

## (81-12) トラスツズマブの修飾部位の解析条件

LC-MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Proteome Discoverer version 1.4 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いて行った。

## 【1509】

Proteome Discovererでの解析は、Sequest HTを検索エンジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を350~5000 Da、Total Intensity Thresholdをピークトップの強度の0.01%となるように設定した。また、トリプシンを消化酵素として設定し、Maximum Missed Cleavage Sitesは3とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンのMass Toleranceは、それぞれ5 ppmおよび0.5 Daとした。Static Modificationにはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl (+57.021 Da)を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニン残基の酸化(+15.995 Da)およびリジン残基への修飾体(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019 Da))を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。

## 【1510】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図4に示される(1)、(3)を用いた。

## 【1511】

## (81-13) トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019 Da))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 1269.30359、理論値:1269.30273、3価)が観測され(図96)、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける246位もしくは248位のリジン残基の修飾を示す、1価のy9に相当するm/z 1205.86(理論値:1205.60)のプロダクトイオンが確認された(図97-1)。また、Proteome Discovererでの解析により、246位もしくは248位のリジン残基への修飾が高選択的に起きていることが示された(図97-2)。

## 【1512】

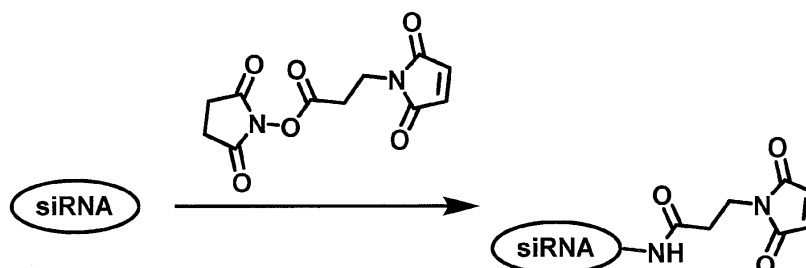
この結果より、(81-9)では抗体上、重鎖上EU numberingにおけるLys 246およびLys 248に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

## 【1513】

## 実施例82: 抗体-核酸コンジュゲートの合成

## (82-1-1) 核酸へのリンカーの導入

## 【化210】



10

20

30

40

50

## 【1514】

siRNA (pH 7.4 PBSバッファー) に対して、3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパン酸(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)(200 mM、DMFに溶解)を100等量加えた。4 にて20時間静置後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製)を用いて精製した。

## 【1515】

以下の配列のsiRNAを使用した。

センス鎖: 5' - 6 - FAM - A (M) C (M) A G C (M) A A A U (M) U (M) C (M) C (M) A U (M) C (M) G U (M) G U (M) - N (6) (配列番号93)

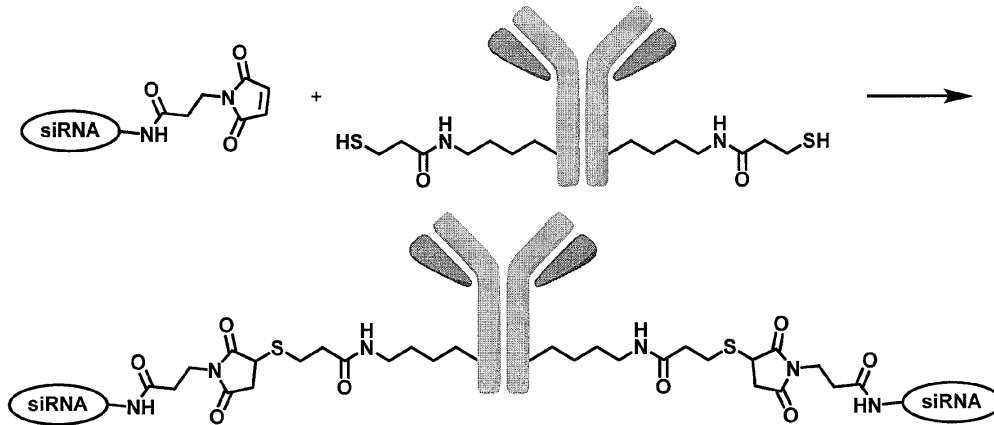
アンチセンス鎖: 5' - p - A C (F) A C (F) G A U (F) G G A A U (F) U (F) U (F) G C (F) U (F) G U (F) U U (配列番号94)

・p: Phosphorylation、(F): 2'-Fluoro、(M): 2'-O-Me (methyl)、N(6): amino C6 linkerを3'末端に付加

## 【1516】

(82-1-2) トラスツズマブ・チオール導入体 - 核酸コンジュゲートの合成

## 【化211】



## 【1517】

(81-7) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体(20 mM PBSバッファー、10 mM EDTA) に対して、(210-1-1) で得たリンカー導入siRNAを10等量加え、4 にて40時間静置した。混合液をAmicon Ultra-0.5 mL 3 kDa (メルクミリポア社製)を用いて精製した後、AKTApurifier (GEヘルスケア社製)を用いてさらに精製した。精製したコンジュゲートはSDS-PAGEにより分析した。

## 【1518】

AKTApurifier (GEヘルスケア社製)による精製は下記の条件で行った。  
カラム: Superdex 200 Increase 10/300 GL (GEヘルスケア社製)

バッファー: pH 7.4 のPBSバッファー

流速: 0.4 ml/min

検出器: 215及び280 nmの波長で検出した。

## 【1519】

(82-2) 抗体 - 核酸コンジュゲートのSDS-PAGEによる分析

(82-1-2) で合成したコンジュゲートをSDS-PAGEにより分析した。スタンダードとしてプレシジョンPlusプロテイン<sup>TM</sup>プレステインドスタンダード(BIO-RAD社製)を用い、染色はバレットCBBステインワン(ナカライテスク社製)で行った(図98)。

## 【1520】

その結果、SDS-PAGEより、非改変抗体に対し、位置選択的に核酸をコンジュゲ

ートできることが分かった。すなわち、Payloadとして、低分子に限らず、核酸も導入可能であることが示された。

【1521】

実施例83：トラスツズマブ・チオール導入体へのアジド基の導入とクリック反応を利用したADC mimicの合成

(83-1)トラスツズマブ・チオール導入体へのアジド基の導入とADC mimicの合成

(83-1-1)トラスツズマブ・チオール導入体へのアジド基の導入

(81-7)で得られたトラスツズマブ・チオール導入体(20mM PBSバッファ、10mM EDTA)に対して、N-[2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル]-2-ヨード-アセトアミド(50mM、DMFに溶解)を50等量加えた。37にて3時間静置後、20mM PBSバッファに置換し、トラスツズマブ・アジド導入体を得た。

10

【1522】

(83-1-2)トラスツズマブ・アジド導入体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(83-1-1)で生成したトラスツズマブ・アジド導入体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ・チオール導入体は50682、50844に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にクリック反応生成物が導入された50895、51057および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図99)。

20

【1523】

(83-1-3)トラスツズマブ・アジド導入体のADC mimicへの変換

(83-1-1)で得られたトラスツズマブ・アジド導入体(20mM PBSバッファ、10mM EDTA)に、ジベンゾシクロオクチン酸(DBCO-Acid、10mM、DMFに溶解)を10等量加えてクリック反応を行い、ADC mimicを得た。

【1524】

(83-1-4)ADC mimicの還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(83-1-3)で生成したADC mimicに7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ・アジド導入体は50896、51058に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にクリック反応生成物が導入された51216、51378および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図100)。

30

【1525】

その結果、トラスツズマブ・チオール導入体とPayloadの間にリンカーを挿入してもADC mimicが合成できることが示された。

【1526】

[実施例84：切断性リンカーの合成とIgG1 Fc結合性ペプチドとの連結]

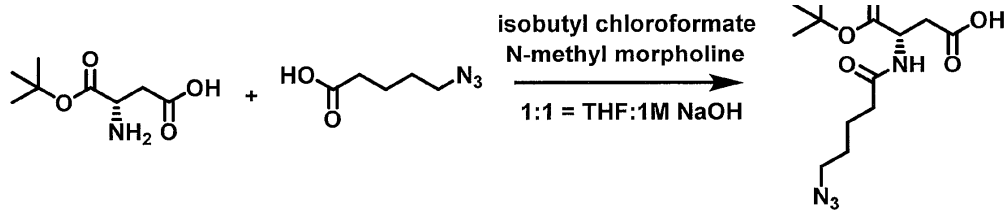
(84)含アジド切断性リンカーの合成とペプチドとの連結

(84-1)含アジドチオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

(84-1-1)含アジドチオエステルリンカーの合成

40

## 【化 2 1 2】



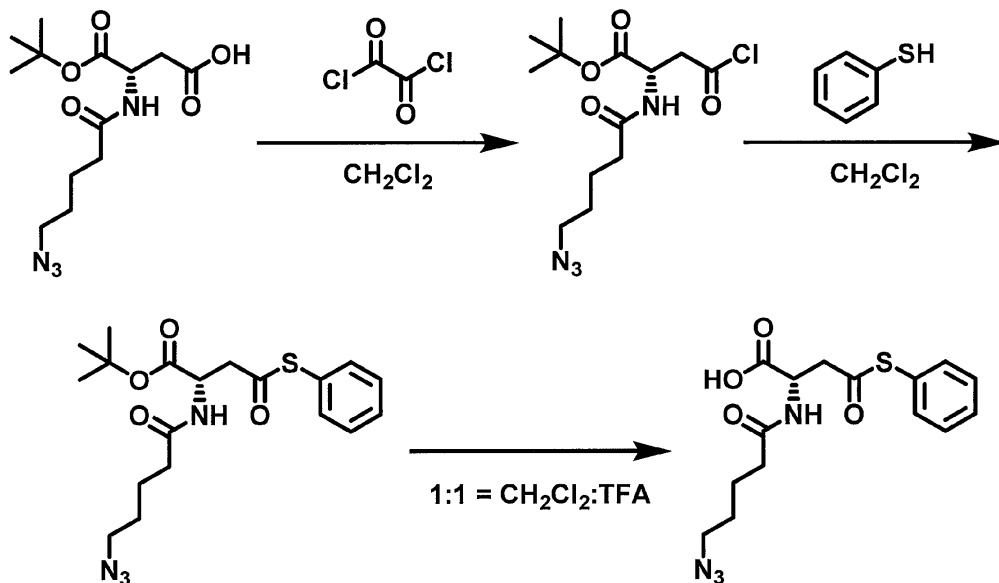
## 【1 5 2 7】

5 - アジドペンタン酸 (200 mg, 1.40 mmol) を THF 溶媒 (7.0 mL) に溶解させ、0 にてクロロギ酸イソブチル (0.220 mL, 1.68 mmol)、N - メチルモルホリン (0.230 mL, 2.10 mmol) を加え 30 分攪拌し、5 - アジドペンタン酸の混合酸無水物を調整した。(3S) - 3 - アミノ - 4 - tert - ブトキシ - 4 - オキソ - プタン酸 (0.397 mg, 2.10 mmol) を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (7.0 mL) に溶解させ、混合液を前述の 5 - アジドペンタン酸の混合酸無水物の THF 溶液に室温にて滴下した。室温にて 16 時間攪拌した後、6 M 塩酸水溶液を加え、系内の pH を 3.0 に調整した。調整後、酢酸エチルによる分液抽出を行い、有機相を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン : メタノール = 10 : 1) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより、(3S) - 3 - (5 - アジドペンタノイルアミノ) - 4 - tert - ブトキシ - 4 - オキソ - プタン酸 (0.380 g, 1.21 mmol) を得た。

## 【1 5 2 8】

MS (ESI)  $m/z$  : 337 [M + Na]<sup>+</sup>

## 【化 2 1 3】



## 【1 5 2 9】

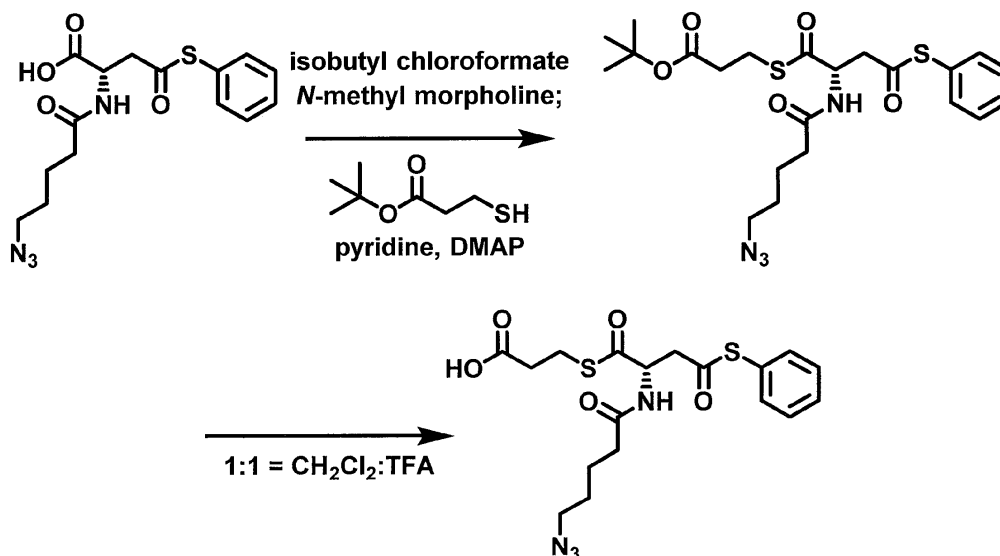
(3S) - 3 - (5 - アジドペンタノイルアミノ) - 4 - tert - ブトキシ - 4 - オキソ - プタン酸 (0.380 g, 1.21 mmol) をジクロロメタン 6.0 mL に溶解させ、オキサリルクロライド (0.125 mL, 1.45 mmol) と N, N' - ジメチルホルムアミド (4.68 μL, 0.0605 mmol) を氷冷下滴下し、30 分間攪拌した。30 分後、ピリジン (0.196 mL, 2.42 mmol) 及びチオフェノール (0.185 mL, 1.81 mmol) とジメチルアミノピリジン (14.8 mg, 0.121 mmol) の混合液を滴下し、室温にて 2 時間攪拌した。2 時間後、0.1 M 塩酸水溶液 6.0 mL を加え、ジクロロメタンによる分液抽出を行った後、有機層を減圧濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル) にて精製した。生成物が含まれるフ



ラクシオンを回収し、減圧下濃縮することにより得られた残渣にジクロロメタン 3.0 mL 及びトリフルオロ酢酸 3.0 mL を加え、室温下 1 時間攪拌した。1 時間後、反応液を減圧濃縮することで (2S)-2-(5-アジドペンタノイルアミノ)-4-オキソ-4-フェニルスルファニル-ブタン酸 (150 mg, 0.428 mmol) を得た。

MS (ESI)  $m/z$ : 351 [M+H]<sup>+</sup>

【化 214】



10

20

【1530】

(2S)-2-(5-アジドペンタノイルアミノ)-4-オキソ-4-フェニルスルファニル-ブタン酸 (0.150 g, 0.428 mmol) を THF 溶媒 (4.3 mL) に溶解させ、0 にてクロロギ酸イソブチル (0.0674 mL, 0.514 mmol)、N-メチルモルホリン (0.0706 mL, 0.642 mmol) を加え 30 分攪拌し、混合酸無水物を調整した。ピリジン (0.0695 mL, 0.857 mmol) 及び 3-スルファニルプロパン酸 tert-ブチル (0.139 mL, 0.857 mmol) とジメチルアミノピリジン (5.20 mg, 0.0428 mmol) を THF 溶媒 (1.0 mL) に溶解させ、混合液を前述の混合酸無水物の THF 溶液に室温にて滴下した。室温にて 3 時間攪拌した後、0.1 M 塩酸水溶液 4.3 mL を加え、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、有機層を減圧濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより得られた残渣にジクロロメタン 2.0 mL 及びトリフルオロ酢酸 2.0 mL を加え、室温下 1 時間攪拌した。1 時間後、反応液を減圧濃縮することで 3-[(2S)-2-(5-アジドペンタノイルアミノ)-4-オキソ-4-フェニルスルファニル-ブタノイル]スルファニルプロパン酸 (43.8 mg, 0.100 mmol) を得た。

30

【1531】

MS (ESI)  $m/z$ : 439 [M+H]<sup>+</sup>

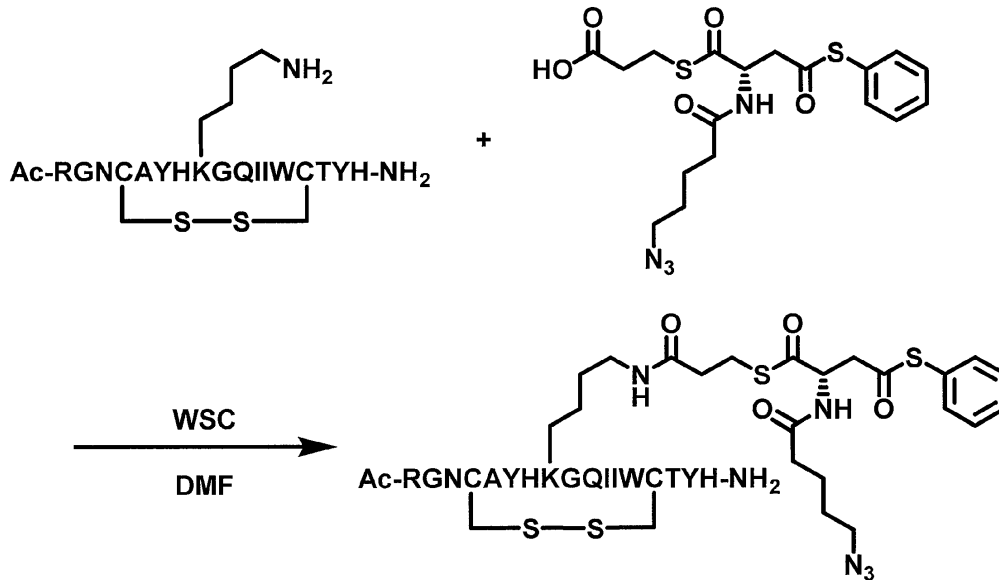
40

【1532】

(84-1-2) チオエステルリンカーとペプチドの連結

50

## 【化 2 1 5】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号5である。

## 【1533】

(84-1)で合成したAc-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (配列番号5) (9.8 mg, 4.7 μmol、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。)をN,N'-ジメチルホルムアミド1 mLに溶解し、3-[(2S)-2-(5-アジドペンタノイルアミノ)-4-オキソ-4-フェニルスルファニル-ブタノイル]スルファニルプロパン酸(30.9 mg, 0.0704 mmol), WSC·HCl(13.5 mg, 0.0704 mmol)を加えた。室温で3時間攪拌した後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体(3.76 mg, 1.50 μmol)を得た。

20

## 【1534】

MS (ESI) m/z : z = 2 1255 [M + 2H]<sup>2+</sup>, z = 3 837 [M + 3H]<sup>3+</sup>

30

## 【1535】

(84-2)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(84-1)で合成したペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し5.01 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)707 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5)220 μLに溶解させ、5.01 mMのペプチド試薬を19.1 μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。

40

## 【1536】

(84-3)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(84-2)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にペプチド-リンカー連結物が導入された52996、53158および、原料と同じ23439に

50

軽鎖ピークが観測された(図101)。

【1537】

(84-4)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析  
(84-2)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。  
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【1538】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドアジドリンカー連結物-NHS活性化体10等量;

【1539】

Retention Time 11.2765分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図102)。

【1540】

(84-5)トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断

(84-2)で得られたトラスツズマブ・ペプチド複合体(20 mM PBSバッファ)をAmicon 10Kにより、0.5 Mヒドロキシルアミン、10 mM EDTA (pH 6.0)溶液へと置換し、室温で2時間静置した。2時間後、20 mM PBSバッファ、10 mM EDTA (pH 7.4)へと置換し、トラスツズマブ・チオール導入体を得た。

20

【1541】

(84-6)トラスツズマブ・アジド導入体の特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(84-5)で生成したトラスツズマブ・チオール導入体に7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594、50756に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50850、51012および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図103)。

30

【1542】

(84-7)トラスツズマブ・アジド導入体の特異的修飾のHIC-UPLC解析

(84-5)で生成した抗体・アジド導入体と原料の抗体・ペプチド複合体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

40

【1543】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ・ペプチド複合体

b: トラスツズマブ・アジド導入体;

【1544】

Retention Time 9.8588分はアジドが2個導入された化合物であると考えられる(図104)。

【1545】

50

(84-8) One-pot法によるトラスツズマブ・アジド導入体の合成

(84-1)で合成したペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体をN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.1mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)1.29mgを60mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 5.5)123.8μLに溶解させ、21.1mMのペプチド試薬を10.8μL(抗体に対して15等量)加えて、室温で1時間攪拌した。その後、0.5Mヒドロキシルアミン、10mM EDTA(pH 5.5)溶液を酢酸ナトリウムと同量添加し、室温で2時間静置した。2時間後、20mM PBSバッファ、10mM EDTA(pH 7.4)へと置換し、トラスツズマブ・アジド導入体を得た。

【1546】

(84-9)トラスツズマブ・アジド導入体のトリプシン処理

(84-8)で得られたトラスツズマブ・アジド導入体を、上記(81-10)と同様に処理し、LC-MS/MS測定を実施した。

【1547】

(84-10)トリプシン消化物のLC-MS/MS測定条件

分析装置、HPLC分析条件、質量分析計分析条件は、上記(81-11)と同様である。

【1548】

(84-11)トラスツズマブの修飾部位の解析条件

LC-MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Dynamic Modificationsの設定を除き、上記(81-12)と同様である。Dynamic Modificationsについては、メチオニン残基の酸化(+15.995Da)およびリジン残基への修飾体(アジド導入体(+255.097Da)、アミン導入体(+229.106)、アジドカルボン酸導入体(+240.086)、アミンカルボン酸導入体(+214.095))を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。

【1549】

(84-12)トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(アジドカルボン酸導入体(+240.086))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPCPCAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMISR(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 1300.99241、理論値:1300.99173、3価)が観測され(図105)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける246位もしくは248位のリジン残基の修飾を示す、1価のy12に相当するm/z 1622.92(理論値:1622.87)のプロダクトイオンが確認された(図106-1)。また、Proteome Discovererでの解析により、246位もしくは248位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された(図106-2)。

【1550】

この結果より、(84-8)では抗体上、重鎖上EUnumberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【1551】

実施例85:トラスツズマブ・アジド導入体へのクリック反応を利用したADC mimicの合成

(85-1)トラスツズマブ・アジド導入体への低分子導入

(84-5)で得られたトラスツズマブ・アジド導入体(20mM PBSバッファ、10mM EDTA)に対して、ジベンゾシクロオクチン酸(DBCO-Acid、10mM、DMFに溶解)を10等量加えてクリック反応を行い、ADC mimicを得た。

10

20

30

40

50

## 【1552】

(85-2) ADC mimicの還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(85-1)で生成したADC mimicに7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 $\mu$ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ・アジド導入体は50850、51012に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にクリック反応生成物が導入された51169、51330および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された(図107)。

## 【1553】

(85-3)トラスツズマブ・アジド導入体の特異的修飾のHIC-UPLC解析

(85-1)で生成した抗体・アジド導入体と原料の抗体・ペプチド複合体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6 $\times$ 100mm 2.5 $\mu$ mを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

## 【1554】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

- a:トラスツズマブ・アジド導入体  
b:ADC mimic;

## 【1555】

Retention Time 10.3216分は低分子が2個導入された化合物であると考えられる(図108)。

## 【1556】

(85-4)ADC mimicのトリプシン処理

(85-1)で得られたADC mimicを、上記(81-10)と同様に処理し、LC-MS/MS測定を実施した。

## 【1557】

(85-5)トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

分析装置、HPLC分析条件、質量分析計分析条件は、上記(81-11)と同様である。

## 【1558】

(85-6)トラスツズマブの修飾部位の解析条件

LC-MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Dynamic Modificationsの設定を除き、上記(81-12)と同様である。Dynamic Modificationsについては、メチオニン残基の酸化(+15.995Da)およびリジン残基への修飾体(DBCO-Acid導入体(+574.218)、DBCO-Acidカルボン酸導入体(+559.207)、アジド導入体(+255.097)、アジドカルボン酸導入体(+240.086))を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。

## 【1559】

(85-7)トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(DBCO-Acidカルボン酸導入体(+559.207))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 1055.77631、理論値:1055.77600、4価)が観測され(図109)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける246位も

10

20

30

40

50

しくは248位のリジン残基の修飾を示す、2価のy12に相当するm/z 971.71 (理論値: 971.50)のプロダクトイオンが確認された(図110-1)。また、Proteome Discovererでの解析により、246位もしくは248位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された(図110-2)。

【1560】

この結果より、(85-1)では抗体上、重鎖上EU numberingにおけるLys246およびLys248に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【1561】

実施例86: 抗TNF- IgG1抗体アダリムマブの特異的修飾

10

(86-1) 抗TNF- IgG1抗体アダリムマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(81-3)で合成したペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗TNF- IgG1抗体アダリムマブ(エーザイ)500μgを50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH5.5)200μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー(pH2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のアダリムマブは148086にピークが観測され、反応物は結合性ペプチドが二つ導入された生成物が152605にピーク

20

【1562】

(86-2) 抗TNF- IgG1抗体アダリムマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(86-1)で生成したアダリムマブ・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

30

【1563】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: アダリムマブ原料

b: アダリムマブ+ペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体10等量;

【1564】

Retention Time 10.5137分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図112)。

【1565】

(86-3) アダリムマブ・ペプチド複合体のリンカー切断

40

(86-2)で得られたアダリムマブ・ペプチド複合体(20mM PBSバッファー)をAmicon3Kにより、0.5Mヒドロキシルアミン、10mM EDTA(pH5.5)溶液へと置換し、室温で2時間静置した。2時間後、20mM PBSバッファー、10mM EDTA(pH7.4)へと置換し、アダリムマブ・チオール導入体を得た。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のアダリムマブ・ペプチド複合体は152606にピークが観測され、反応物のアダリムマブ・チオール導入体は148264にピークが確認された(図113)。

【1566】

(86-4) アダリムマブ・チオール導入体のHIC-UPLC解析

(863)で生成したアダリムマブ・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析

50

した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

【1567】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: アダリムマブ・ペプチド-リンカー連結物

b: アダリムマブ・チオール導入体;

10

【1568】

Retention Time 8.9039分はチオールが2個導入された化合物であると考えられる(図114)。

【1569】

(86-5) アダリムマブ・チオール導入体への蛍光標識

(86-3)で得られたアダリムマブ・チオール導入体(20 mM PBSバッファー、10 mM EDTA)に対して、フルオレセイン-5-マレイミド(10 mM、DMSOに溶解)を5等量加えた。室温にて1時間静置後、20 mM PBSバッファーに置換し、アダリムマブ蛍光標識体(ADC mimic)を得た。

【1570】

(86-6) アダリムマブ蛍光標識体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(86-5)で生成したアダリムマブ蛍光標識体(ADC mimic)に7 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料、生成物ともに軽鎖は同じピークが観測され、原料のアダリムマブは50730に重鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にフルオレセインが導入された51156ピークが観測された(図115)。

20

【1571】

実施例87: 抗RANKL IgG2抗体デノスマブの特異的修飾

30

(87-1) 抗RANKL IgG2抗体デノスマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(81-3)で合成したペプチド-リンカー連結物-チオフェノール活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗RANKL IgG2抗体デノスマブ(第一三共)500 μgを50 mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5)200 μLに溶解させ、4 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mM クエン酸ナトリウムバッファー(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のデノスマブは147358.97にピークが観測され、反応物は結合性ペプチドが二つ導入された生成物が151878.61にピークが確認された(図116)。

40

【1572】

(87-2) 抗RANKL IgG2抗体デノスマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(87-1)で生成したデノスマブ・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0、B\_\_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280 nmの波長で検出した。

50

## 【1573】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : デノスマブ原料

b : デノスマブ + ペプチド - リンカー - 連結物 - チオフェノール活性化体 10 等量 ;

## 【1574】

Retention Time 10.1314分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図117)。

## 【1575】

(87-3) デノスマブ・ペプチド複合体のリンカー切断

(87-2)で得られたデノスマブ・ペプチド複合体(20mM PBSバッファー)をAmicon3Kにより、0.5Mヒドロキシルアミン、10mM EDTA(pH5.5)溶液へと置換し、室温で2時間静置した。2時間後、20mM PBSバッファー、10mM EDTA(pH7.4)へと置換し、デノスマブ・チオール導入体を得た。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のデノスマブ・ペプチド複合体は151878にピークが観測され、反応物のデノスマブ・チオール導入体は147535にピークが確認された(図118)。

10

## 【1576】

(87-4) デノスマブ・チオール導入体のHIC-UPLC解析

(87-3)で生成したデノスマブ・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B\_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40% A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

20

## 【1577】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : デノスマブ・ペプチド - リンカー - 連結物

b : デノスマブ・チオール導入体 ;

## 【1578】

Retention Time 8.6368分はチオールが2個導入された化合物であると考えられる(図119)。

30

## 【1579】

(87-5) デノスマブ・チオール導入体への蛍光標識

(87-3)で得られたデノスマブ・チオール導入体(20mM PBSバッファー、10mM EDTA)に対して、フルオレセイン-5-マレイミド(10mM、DMSOに溶解)を5等量加えた。室温にて1時間静置後、20mM PBSバッファーに置換し、デノスマブ蛍光標識体(ADC mimic)を得た。

## 【1580】

(87-6) デノスマブ蛍光標識体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

40

(87-5)で生成したデノスマブ蛍光標識体(ADC mimic)に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料、生成物ともに軽鎖は同じピークが観測され、原料のデノスマブは50292に重鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にフルオレセインが導入された50717ピークが観測された(図120)。

## 【1581】

実施例88: 抗IL-4/13受容体 IgG4抗体デュピルマブの特異的修飾

(88-1) 抗IL-4/13受容体 IgG4抗体デュピルマブの特異的修飾とESI

50



- T O F M Sによる解析

( 8 1 - 3 )で合成したペプチド - リンカー - 連結物 - チオフェノール活性化体はN , N ' - ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗IL - 4 / 13受容体 IgG 4抗体デュピルマブ ( S a n o f i ・ R e g e n e r o n ) 500μgを50mM酢酸ナトリウムバッファー ( p H 5 . 5 ) 200μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を4.7μL ( 抗体に対して10等量 ) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー ( p H 2 . 9 ) に置換して反応を停止させ、さらに20mM PBSバッファーに置換した。E S I - T O F M Sにより質量を測定したところ、原料のデュピルマブは149796にピークが観測され、反応物は結合性ペプチドが二つ導入された生成物が154315にピークが確認された ( 図121 ) 。

10

【1582】

( 8 8 - 2 ) 抗IL - 4 / 13受容体 IgG 4抗体デュピルマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析

( 8 8 - 1 )で生成したデュピルマブ・ペプチド複合体と原料の抗体をH I Cにより解析した。カラムはP r o t e i n - P a k H i R e s H I C C o l u m n ( W a t e r s ) 4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer : 0.1M P i N a , 2.3M ( N H 4 ) 2 S O 4 , p H 7 . 0、B\_\_Buffer : 0.1M P i N a , p H 7 . 0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100% , 16min ( データ採取20min )、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

20

【1583】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : デュピルマブ原料

b : デュピルマブ + ペプチド - リンカー - 連結物 - チオフェノール活性化体10等量 ;

【1584】

R e t e n s i o n T i m e 12.5569分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる ( 図122 ) 。

【1585】

( 8 8 - 3 )デュピルマブ・ペプチド複合体のリンカー切断

( 8 8 - 2 )で得られたデュピルマブ・ペプチド複合体 ( 20mM P B Sバッファー ) をA m i c o n 3 Kにより、0.5Mヒドロキシルアミン、10mM E D T A ( p H 5 . 5 ) 溶液へと置換し、室温で2時間静置した。2時間後、20mM P B Sバッファー、10mM E D T A ( p H 7 . 4 ) へと置換し、デュピルマブ・チオール導入体を得た。E S I - T O F M Sにより質量を測定したところ、原料のデュピルマブ・ペプチド複合体は154315にピークが観測され、反応物のデュピルマブ・チオール導入体は149975にピークが確認された ( 図123 ) 。

30

【1586】

( 8 8 - 4 )デュピルマブ・チオール導入体のH I C - U P L C解析

( 8 8 - 3 )で生成したデュピルマブ・ペプチド複合体と原料の抗体をH I Cにより解析した。カラムはP r o t e i n - P a k H i R e s H I C C o l u m n ( W a t e r s ) 4.6x100mm 2.5μmを使用した。A\_\_Buffer : 0.1M P i N a , 2.3M ( N H 4 ) 2 S O 4 , p H 7 . 0、B\_\_Buffer : 0.1M P i N a , p H 7 . 0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA 60% B 40% A 0% B 100% , 16min ( データ採取20min )、カラム温度は40、サーモスタット温度は40、検出器は280nmの波長で検出した。

40

【1587】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : デュピルマブ・ペプチド - リンカー - 連結物

b : デュピルマブ・チオール導入体 ;

【1588】

50

Retention Time 11.4941分はチオールが2個導入された化合物であると考えられる(図124)。

【1589】

(88-5) デュピルマブ・チオール導入体への蛍光標識

(88-3) で得られたデュピルマブ・チオール導入体(20mMPBSバッファー、10mMEDTA)に対して、フルオレセイン-5-マレイミド(10mM、DMSOに溶解)を5等量加えた。室温にて1時間静置後、20mMPBSバッファーに置換し、デュピルマブ蛍光標識体(ADCmimic)を得た。

【1590】

(88-6) デュピルマブ蛍光標識体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(88-5) で生成したデュピルマブ蛍光標識体(ADCmimic)に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料、生成物ともに軽鎖は同じピークが観測され、原料のデュピルマブ・チオール導入体は50973に重鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にフルオレセインが導入された51399ピークが観測された(図125)。

【1591】

(まとめ)

以上の結果をまとめると、以下のとおりである。

【1592】

【表2】

表2. 親和性ペプチドのまとめ(その1)

アミノ酸配列	配列番号	実施例
RGNCAYHKGQIIWCTYH	5	1~3、80、81、84
RGNCAYHKGQIVWCTYH	8	4
RGNCAYHKGQVWCTYH	9	5、6
RGNCAYHKGQAVWCTYH	10	7
RGNCAYHKGQLLWCTYH	11	8
RGNCAYHKGQLIWCTYH	12	9
DCAYHKGQIVWCT	13	10
DCAYHKGQVWCT	14	11
DCAYHKGQAVWCT	15	12
RGNCAYHKSQIIWCTYH	16	13
RGNCAYHKNQIIWCTYH	17	14
RGNCAYHKDQIIWCTYH	18	15
RGNCAYHKQQIIWCTYH	19	16
RGNCAYHKEQIIWCTYH	20	17
RGNCAYHKFQIIWCTYH	21	18
RGNCAYHKYQIIWCTYH	22	19
RGNCAYHKWQIIWCTYH	23	20
RGNCAYHKHQIIWCTYH	24	21
RGNCAYHKTQIIWCTYH	25	22
RGNCAYHKLQIIWCTYH	26	23
CAYHKLQIVWC	27	24
CAYHKLQLIWC	28	25
CAYHKSQIVWC	29	26
RGNCAYHKGQLVFCTYH	30	27
RGNCAYHKGQQVWCTYH	31	28
RGNCAYHKGQEVWCTYH	32	29

10

20

30

40

50

【 1 5 9 3 】

【 表 3 】

表 3. 親和性ペプチドのまとめ (その 2)

アミノ酸配列	配列番号	実施例
CAYHKGQLVWC	33	30
RGNCAYHKAQLVWCTYH	34	31
RGNCAYHKVQLVWCTYH	35	32
RGNCAYHKLQLVWCTYH	36	33
RGNCAYHKIQLVWCTYH	37	34
RGNCAYHKSQLVWCTYH	38	35
RGNCAYHKTQLVWCTYH	39	36
RGNCAYHKNQLVWCTYH	40	37
RGNCAYHKDQLVWCTYH	41	38
RGNCAYHKQQLVWCTYH	42	39
RGNCAYHKEQLVWCTYH	43	40
RGNCAYHKFQLVWCTYH	44	41
RGNCAYHKRQLVWCTYH	45	42
RGNCAYHKHQLVWCTYH	46	43
RGNCAYHKWQLVWCTYH	47	44
RGNCAYHKYQLVWCTYH	48	45
RGNCAYFKGQLVWCTYH	49	46
RGNCAYYKGQLVWCTYH	50	47
RGNCAYWKGQLVWCTYH	51	48
RGNCAYRKGQLVWCTYH	52	49
RGNCAYGKGQLVWCTYH	53	50
DCA YHKGQLVWC	54	51
NCA YHKGQLVWC	55	52
CAYHKGQLVWCT	56	53
CAYHKSQLVWC	57	54

10

20

【 1 5 9 4 】

30

40

50

## 【表 4】

表 4. 親和性ペプチドのまとめ (その 3)

アミノ酸配列	配列番号	実施例
RGNC AWHKGGQ I IWCTYH	6 8	5 5
RGNC AFHKGQ I IWCTYH	6 9	5 6
RGNC AHHKGQ I IWCTYH	7 0	5 7
RGNC GYHKGQ I IWCTYH	7 1	5 8
RGNC LYHKGQ I IWCTYH	7 2	5 9
RGNC PYHKGQ I IWCTYH	7 3	6 0
RGNC RYHKGQ I IWCTYH	7 4	6 1
RGNC VYHKGQ I IWCTYH	7 5	6 2
RGNC NYHKGQ I IWCTYH	7 6	6 3
RGNC EYHKGQ I IWCTYH	7 7	6 4
RGNC FYHKGQ I IWCTYH	7 8	6 5
RGNC AYHKGE I IWCTYH	7 9	6 6
RGNC AYHKG N I IWCTYH	8 0	6 7
RGNC AYHKG P I IWCTYH	8 1	6 8
RGNC AYHKG G I IWCTYH	8 2	6 9
RGNC AYHKG D I IWCTYH	8 3	7 0
RGNC AYHKG R I IWCTYH	8 4	7 1
RGNC AYHKG F I IWCTYH	8 5	7 2
RGNC AYHKG H I IWCTYH	8 6	7 3
DCAYHKGQ I IWCT	8 7	7 4
NCAYHKGQ I IWCT	8 8	7 5
GNCA YHKGQ I IWCTY	8 9	7 6
GCAYHKGQ I IWCG	9 0	7 7
GGCA YHKGQ I IWCGG	9 1	7 8
GGGCA YHKGQ I IWCGGG	9 2	7 9

10

20

## 【1595】

また、抗体について、246位及び/又は248位のリジン残基(例、実施例2、6、81、84、85)を始めとする特定のアミノ酸残基の位置選択的な修飾が可能であることが示された。

30

## 【1596】

さらに、下記式(I)で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する下記の化合物について、実施例の一部を例に挙げて説明すると以下の表5のとおりである。

A - L - B - R (I)

[式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

40

Rは、前記抗体に対する反応性基である。]

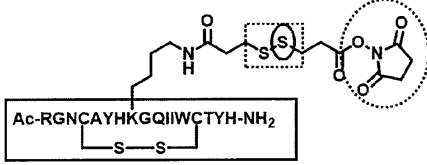
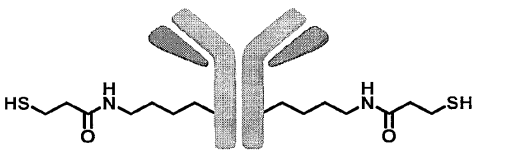
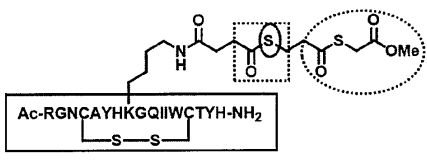
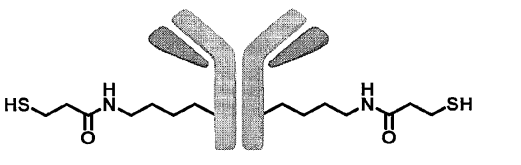
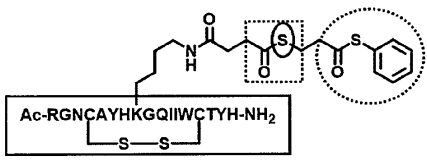
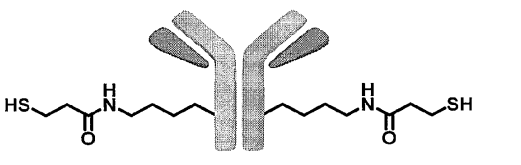
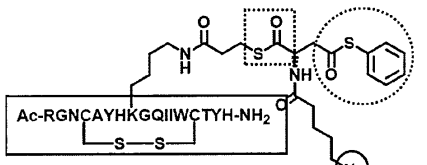
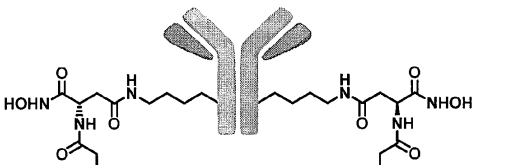
Lは、(i)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2価の基である切断性リンカー、または(ii)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーである。

## 【1597】

50

【表 5】

表 5. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係

実施例	化合物の具体的構造	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する抗体*
1	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
80	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
81	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
84	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	

\*抗体から伸びているNH-C4アルキル部分は、抗体のリジン残基側鎖に由来する（以下同様）

## 【1598】

抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する種々の化合物は、上述のように、抗体に対する親和性物質（A）、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカー（L）、（a）生体直交性官能基を含む2価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない2価の基（B）、抗体に対する反応性基（R）の種類を適宜変更することにより、周知の有機合成方法にしたがって調製することができる。本発明において調製することができる、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係は、以下のとおりである。

## 【1599】

10

20

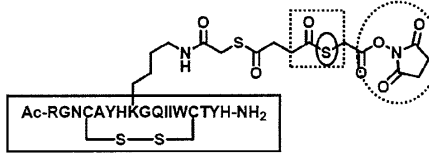
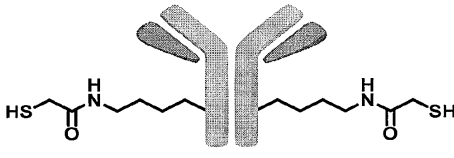
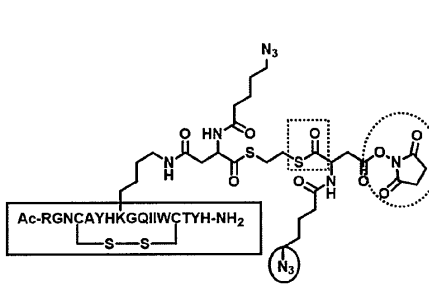
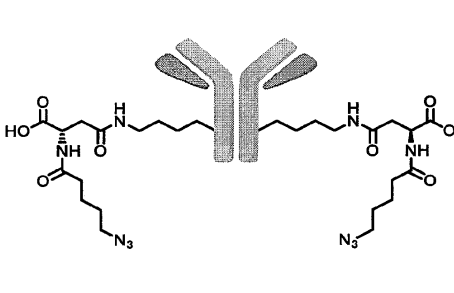
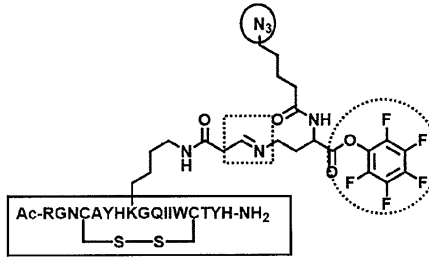
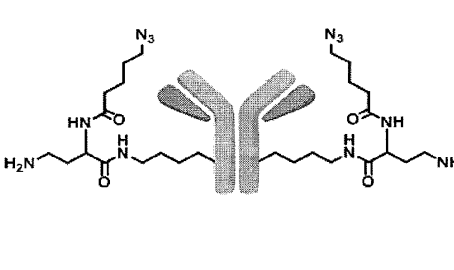
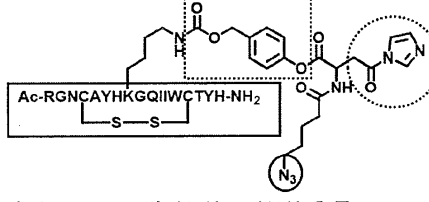
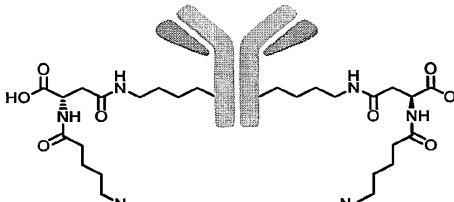
30

40

50

【表 6】

表 6. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係 (その 1)

実施例	化合物の具体的構造 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> 親和性物質(A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> 切断性部分(L中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> 生体直交性官能基 B(a)またはL(ii)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 15px; height: 10px;"></span> 反応性基(R)</div> </div>	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する抗体*
89	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
90	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
91	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
92	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	

10

20

30

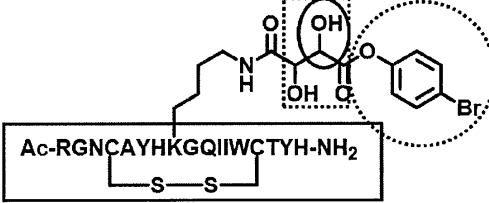
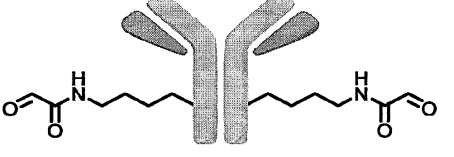
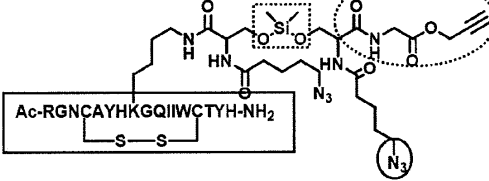
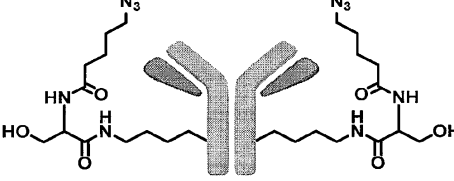
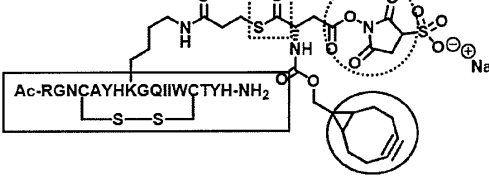
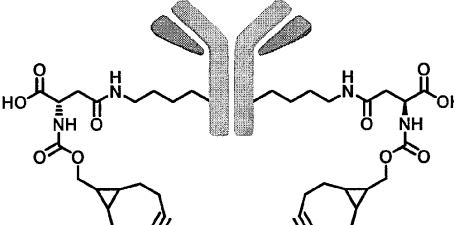
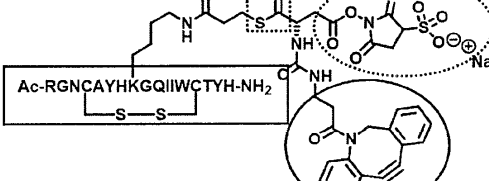
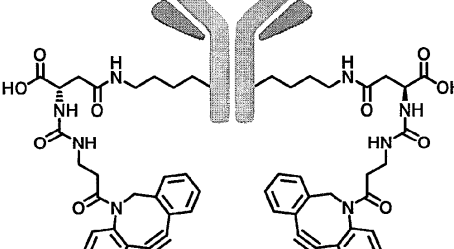
【 1 6 0 0 】

40

50

【表 7】

表 7. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係 (その 2)

実施例	化合物の具体的構造 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 親和性物質 (A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 切断性部分 (L中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 生体直交性官能基 B(a)またはL(ii)</div> <div><span style="border: 1px dotted black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 反応性基 (R)</div> </div>	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する抗体*
93	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
94	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
95	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
96	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	

10

20

30

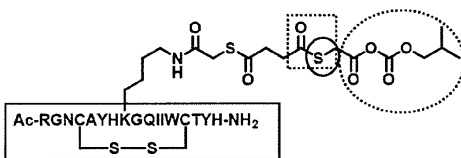
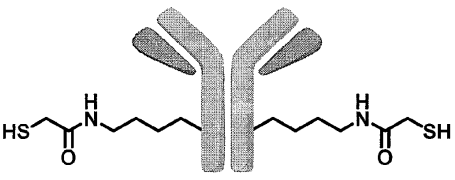
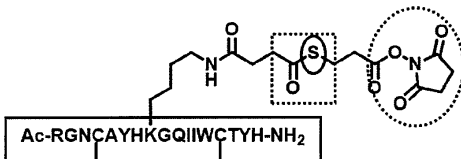
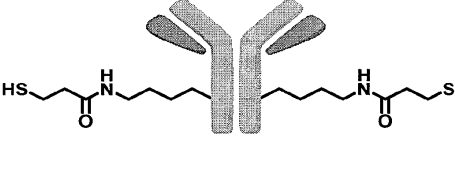
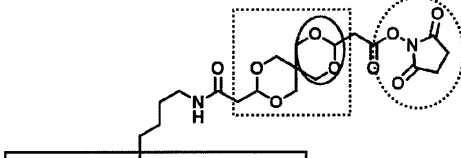
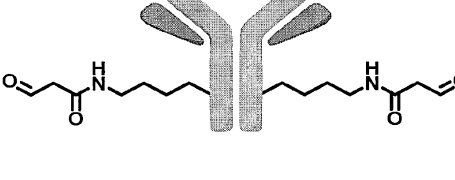
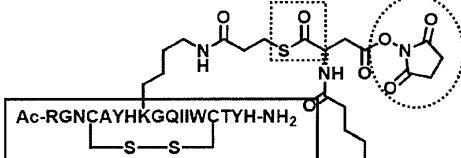
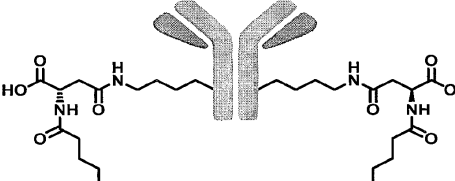
【 1 6 0 1 】

40

50

【表 8】

表 8. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係 (その 3)

実施例	化合物の具体的構造 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 親和性物質 (A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 切断性部分 (L中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 生体直交性官能基 B(a)またはL(ii)</div> <div><span style="border: 1px dotted black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 反応性基 (R)</div> </div>	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する抗体*
97	 <p>Ac-RGNCAYHKGGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub></p> <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
98	 <p>Ac-RGNCAYHKGGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub></p> <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
99	 <p>Ac-RGNCAYHKGGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub></p> <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
100	 <p>Ac-RGNCAYHKGGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub></p> <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	

10

20

30

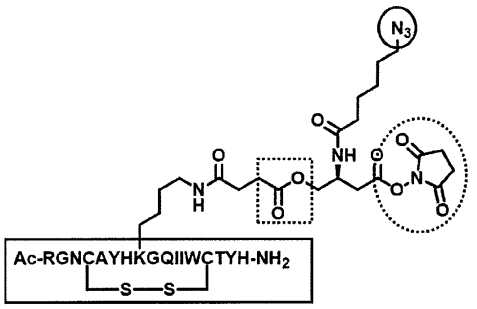
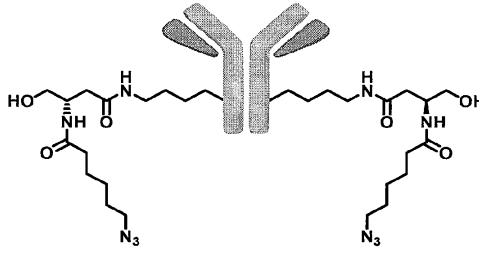
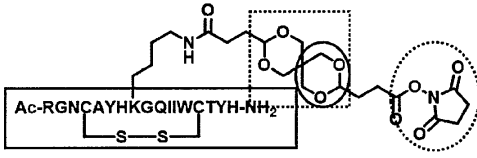
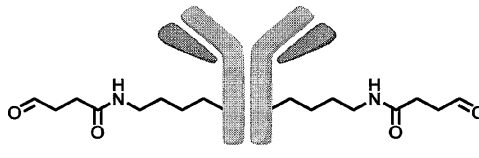
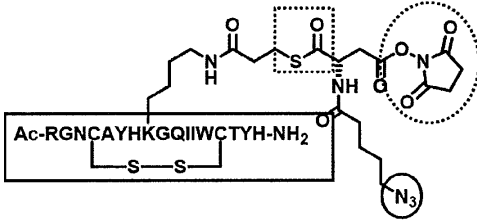
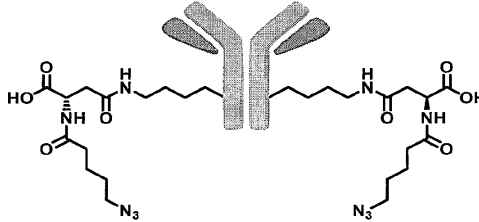
40

【 1 6 0 2 】



【表 9】

表 9. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係 (その 4)

実施例	化合物の具体的構造	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する抗体*
101	<p> <input type="checkbox"/> : 親和性物質 (A)  <input type="checkbox"/> : 切断性部分 (L中)  <input type="checkbox"/> : 生体直交性官能基 B(a) または L(ii)  <input type="checkbox"/> : 反応性基 (R)         </p>  <p>上記アミノ酸配列: 配列番号 5</p>	
102	 <p>上記アミノ酸配列: 配列番号 5</p>	
103	 <p>上記アミノ酸配列: 配列番号 5</p>	

10

20

30

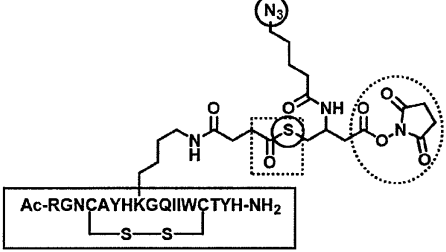
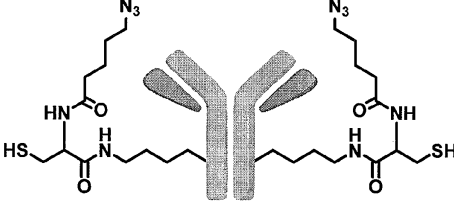
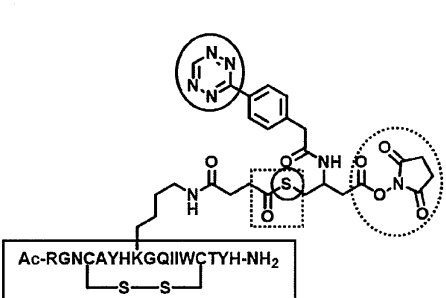
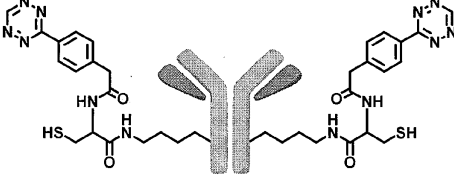
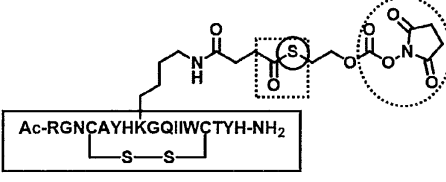

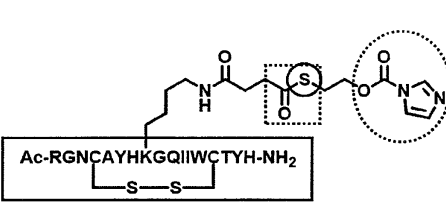

【 1 6 0 3 】

40

50

## 【表 10】

表 10. 抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する抗体との関係 (その 5)

実施例	化合物の具体的構造 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :親和性物質(A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :切断性部分(L中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :生体直交性官能基 B(a)またはL(ii)</div> <div><span style="border: 1px dotted black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :反応性基(R)</div> </div>	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する抗体*
104	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
105	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
106	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	
107	 <p>上記アミノ酸配列：配列番号 5</p>	

10

20

30

40

## 【1604】

以上より、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物において、親和性物質の種類、親和性物質と反応性基との間のリンカーの長さ、およびリンカーが導入される親和性物質中の位置等の因子を適宜調節することにより、抗体を位置選択的に修飾できることが示された。

## 【産業上の利用可能性】

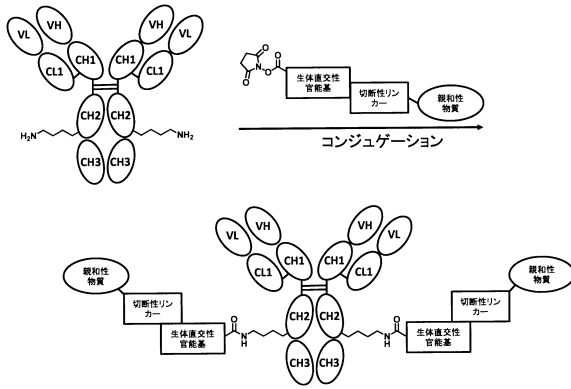
## 【1605】

本発明は、例えば、位置選択的に修飾された抗体の製造に有用である。

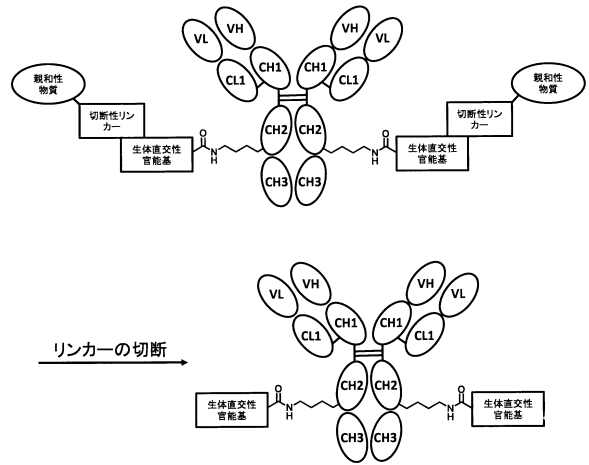
50

【 図面 】

【 図 1 - 1 】



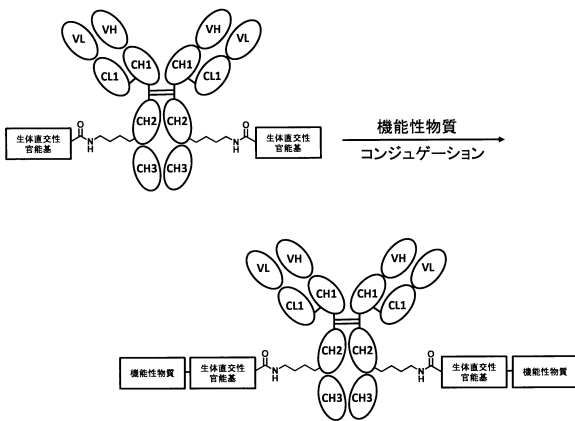
【 図 1 - 2 】



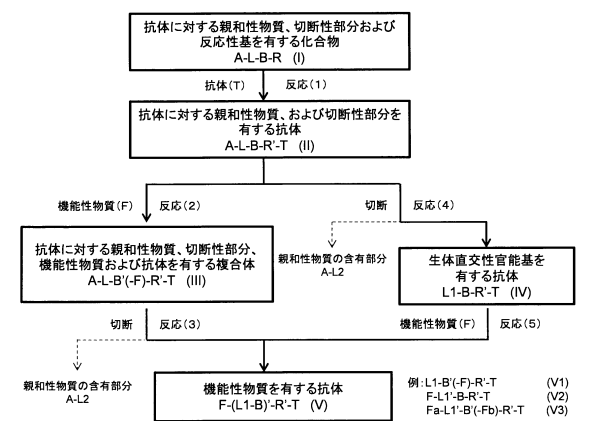
10

20

【 図 1 - 3 】



【 図 2 】



30

40

50

【 図 3 】

PKSCDKTHTCPPCPAPEXXGXPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
 PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 DSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRXEXTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
 IAVEWESNGQPENNYKXTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG (配列番号1)

【 図 4 】

(1) トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA  
 PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY  
 LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSS  
 ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQT  
 YICNVNHKPSNTKVDKDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
 LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHY  
 TQKLSLSLSPG (配列番号2)

(2) I g G 1 F c 領域のアミノ酸配列

IEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT  
 LMI SR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
 PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFFLYSK  
 TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK (配  
 列番号3)

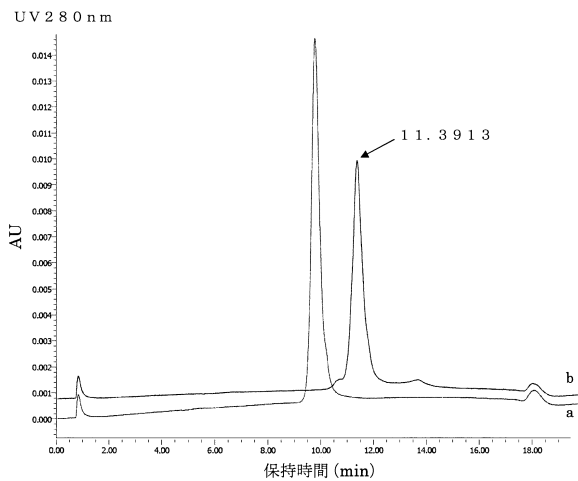
(3) トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPK  
 GKAPKLLIYSASFVPSRFRSGSRSGTDFTLTISSSLQP  
 EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (配列番号4)

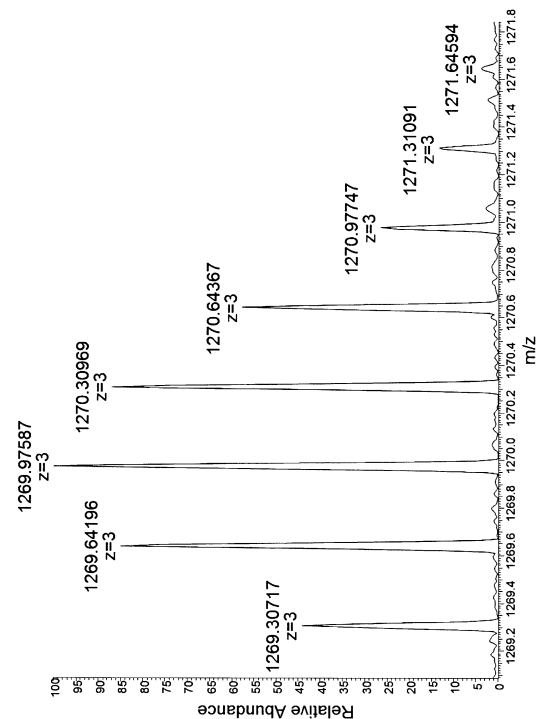
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

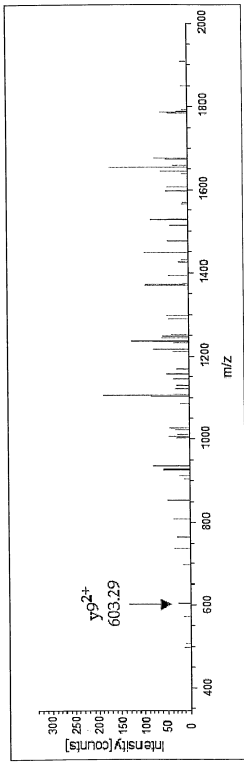


30

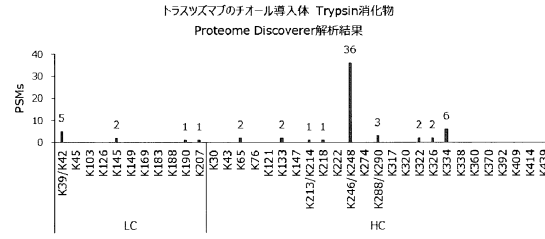
40

50

【 7 - 1 】



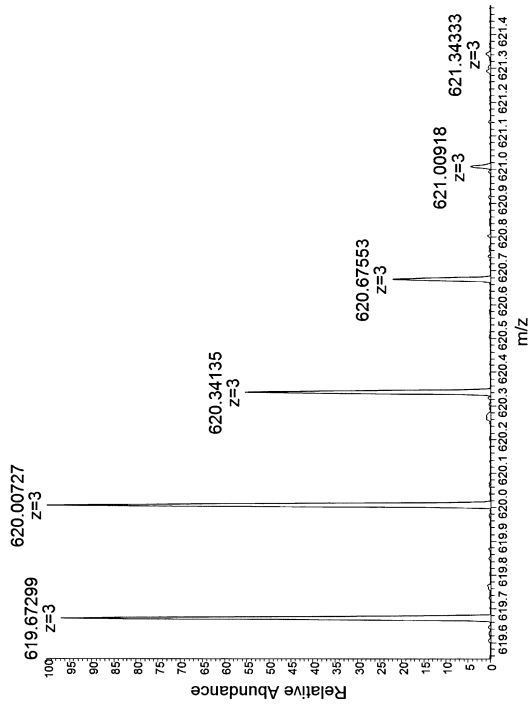
【 7 - 2 】



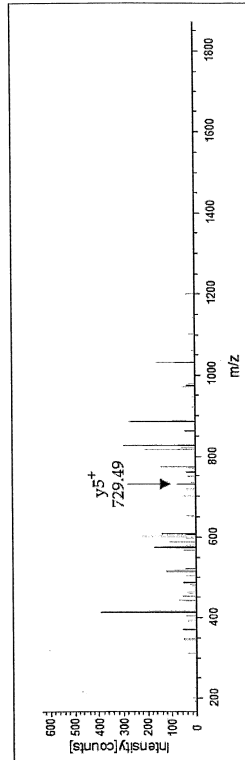
10

20

【 8 】



【 9 - 1 】

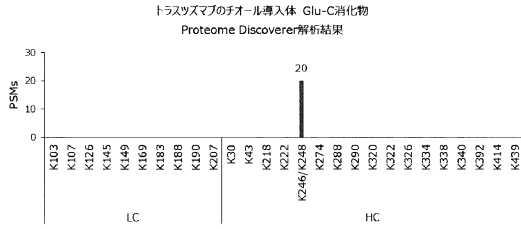


30

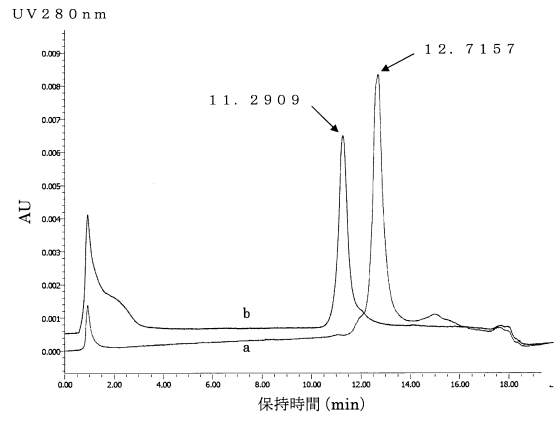
40

50

【 図 9 - 2 】



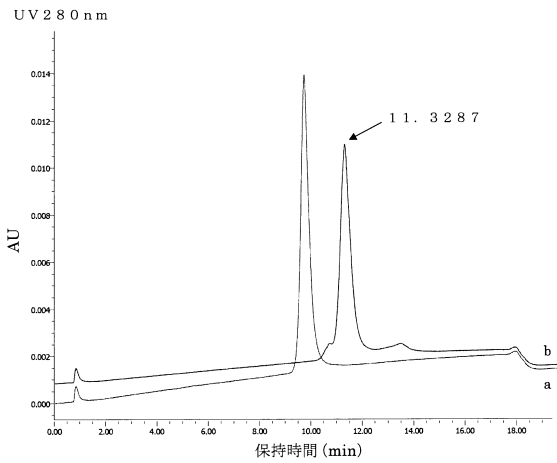
【 図 1 0 】



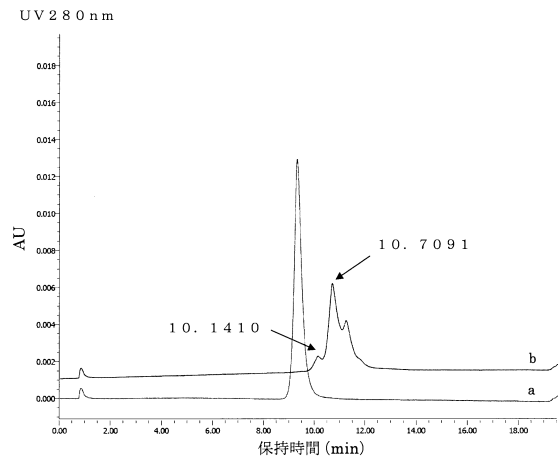
10

20

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

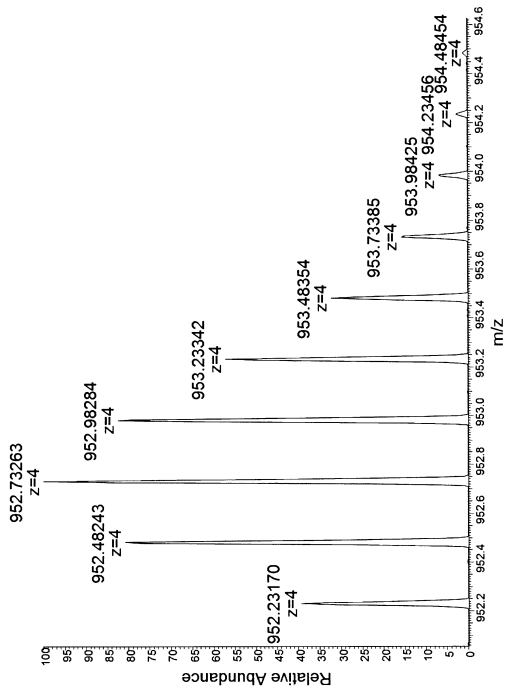


30

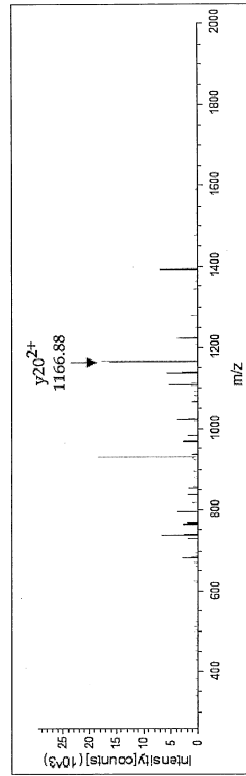
40

50

【 1 3 】



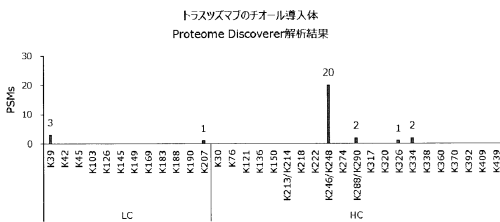
【 1 4 - 1 】



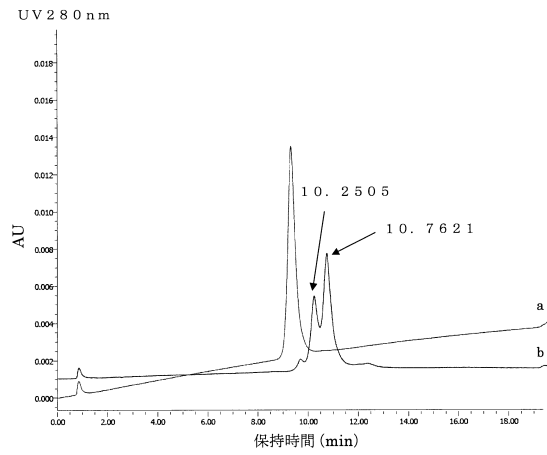
10

20

【 1 4 - 2 】



【 1 5 】

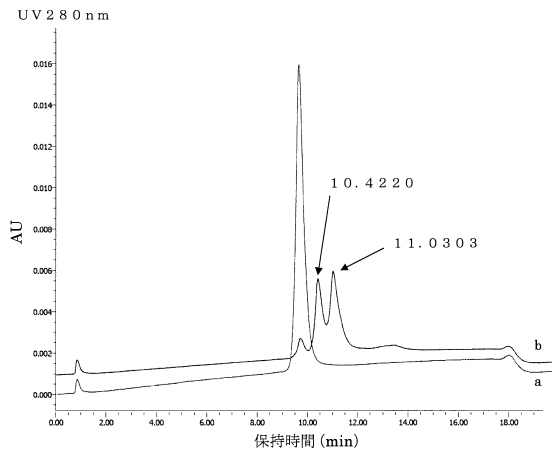


30

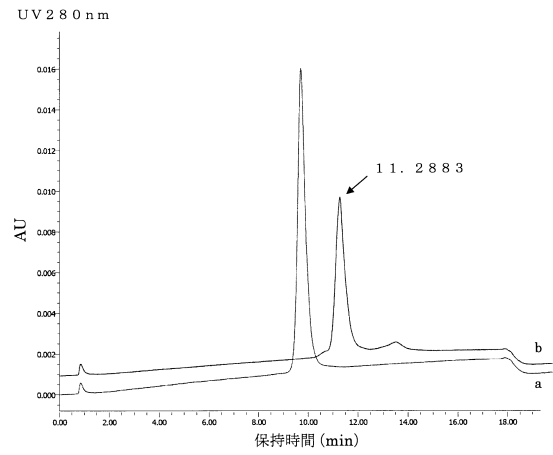
40

50

【 図 1 6 】



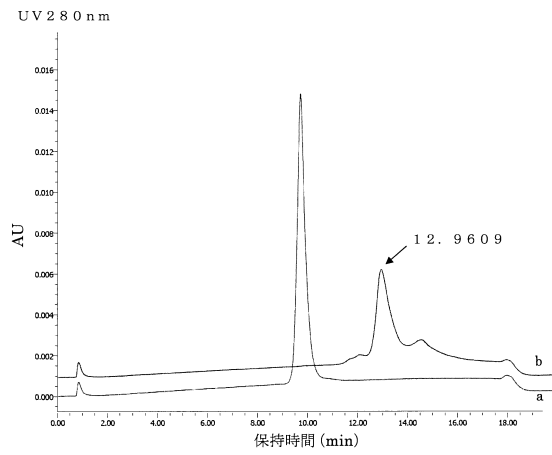
【 図 1 7 】



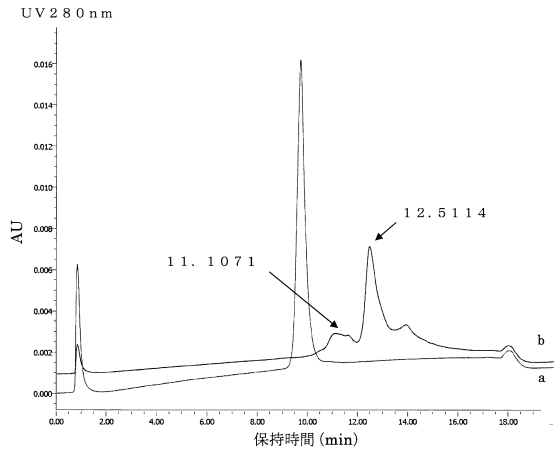
10

20

【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



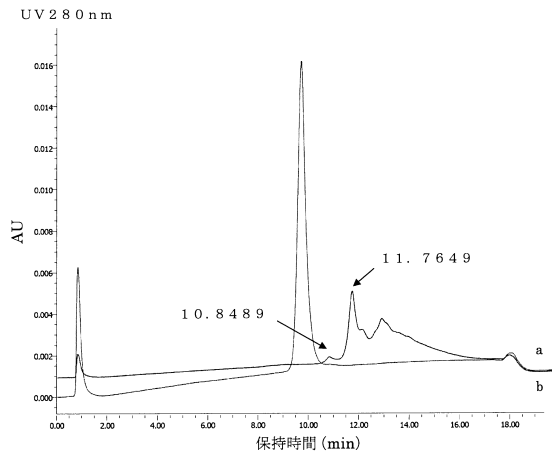
30

40

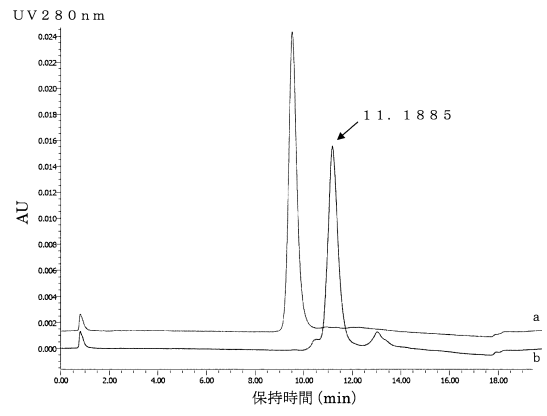
50



【 図 2 0 】



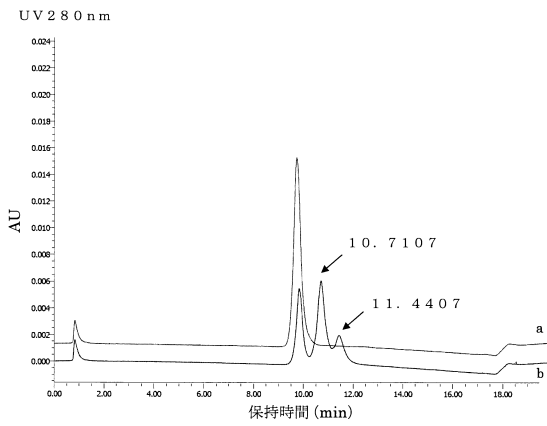
【 図 2 1 】



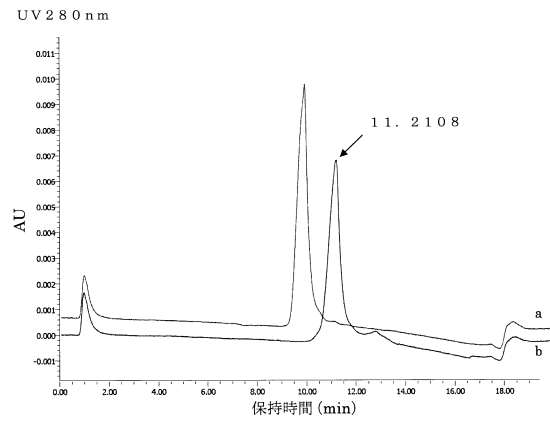
10

20

【 図 2 2 】



【 図 2 3 】

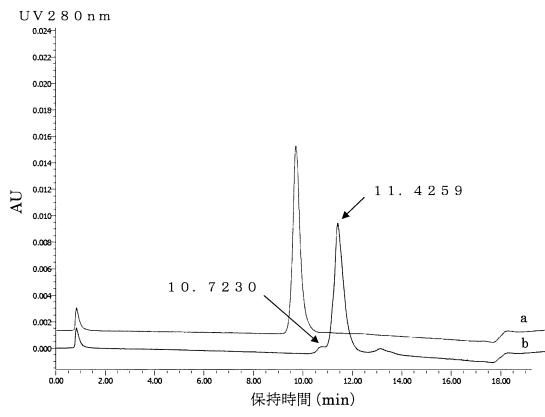


30

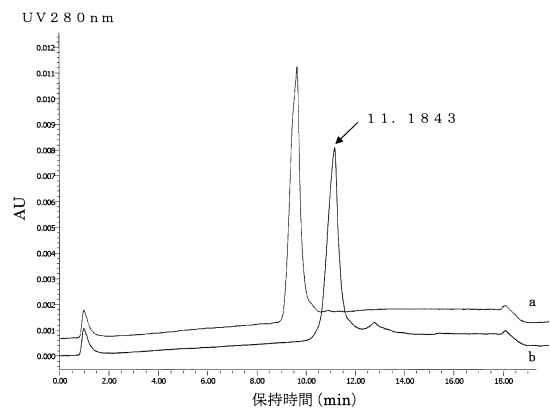
40

50

【 図 2 4 】



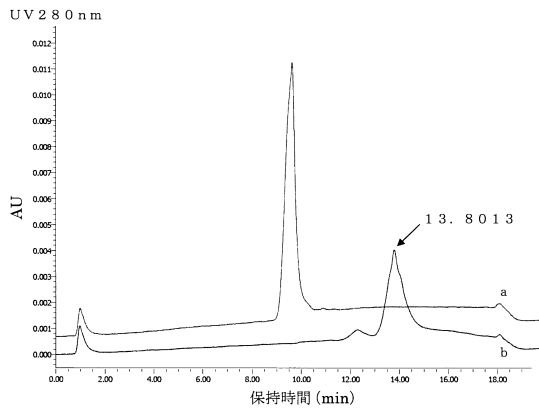
【 図 2 5 】



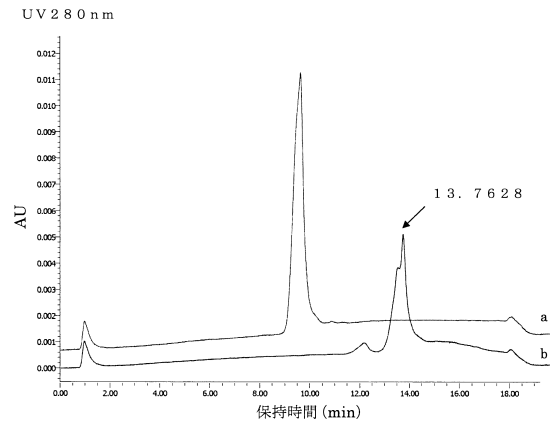
10

20

【 図 2 6 】



【 図 2 7 】

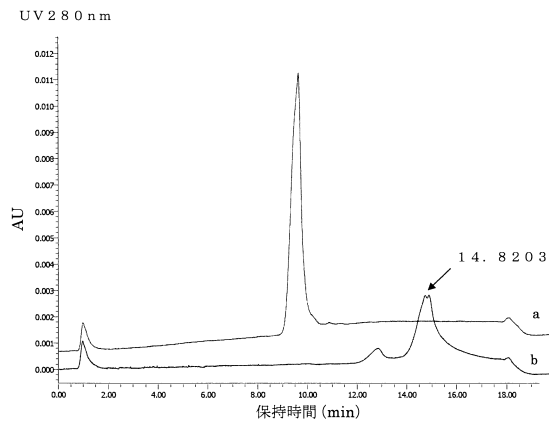


30

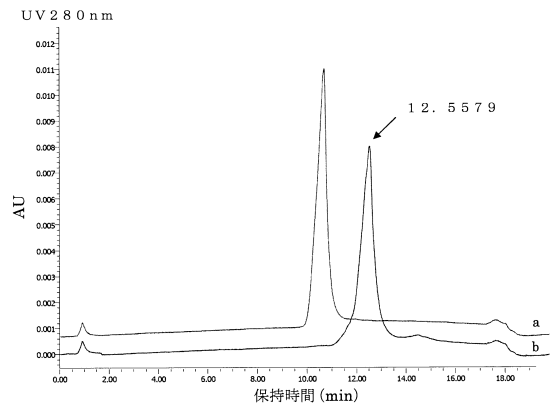
40

50

【 28 】



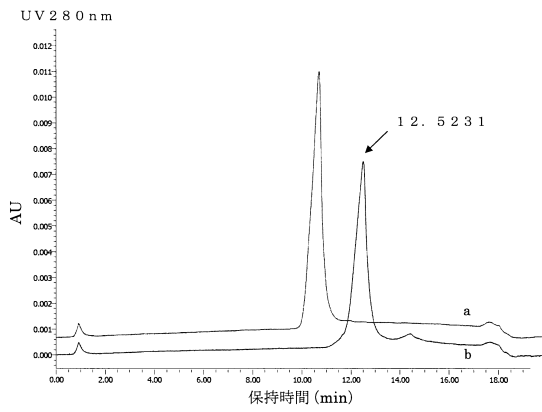
【 29 】



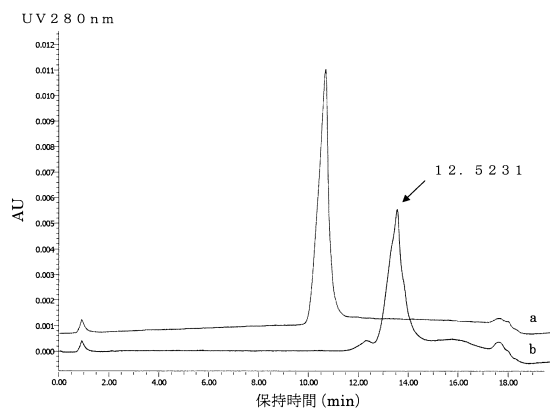
10

20

【 30 】



【 31 】

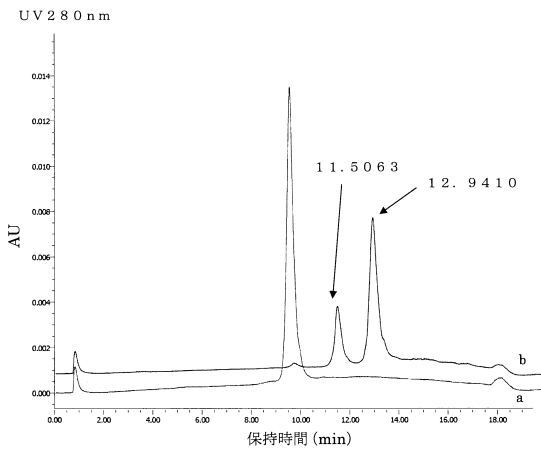


30

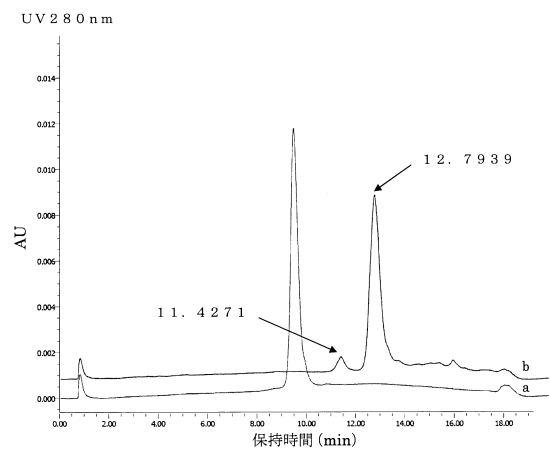
40

50

【 3 2 】



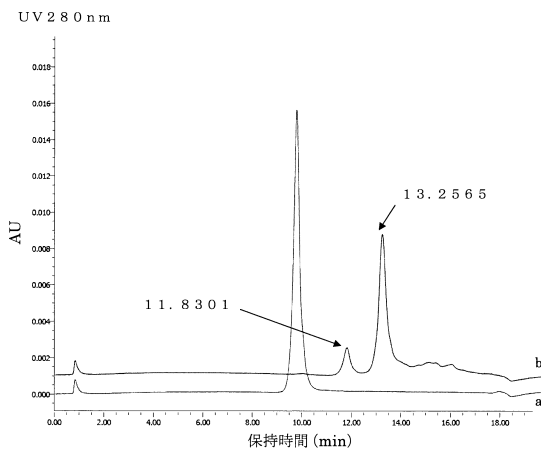
【 3 3 】



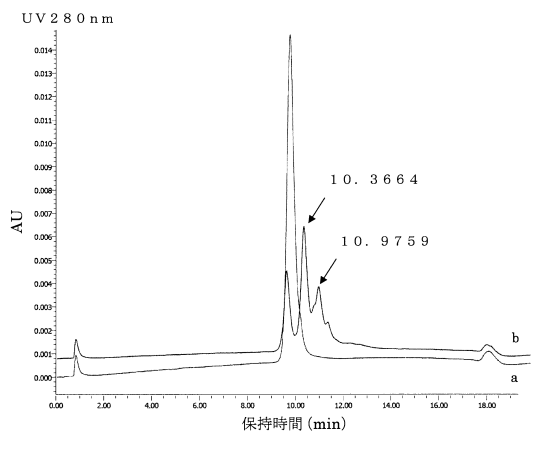
10

20

【 3 4 】



【 3 5 】

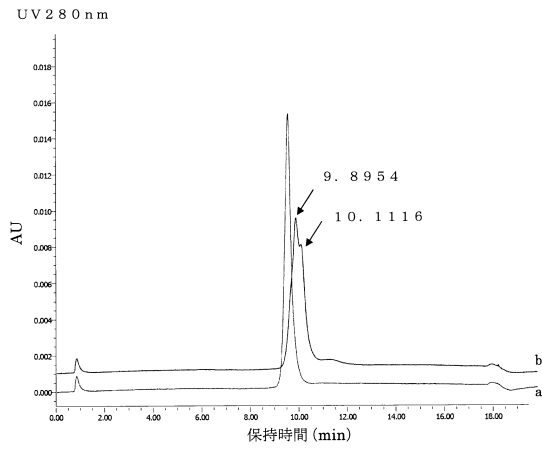


30

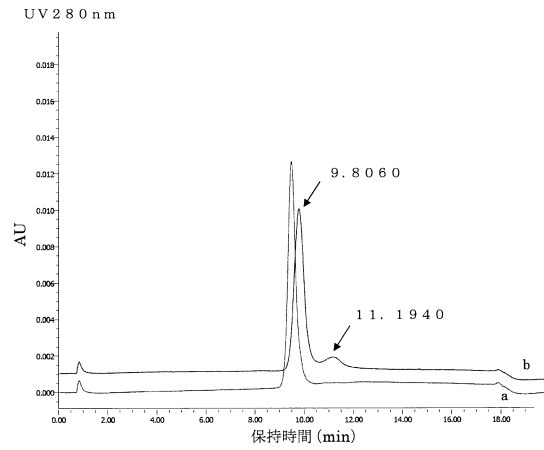
40

50

【 3 6 】



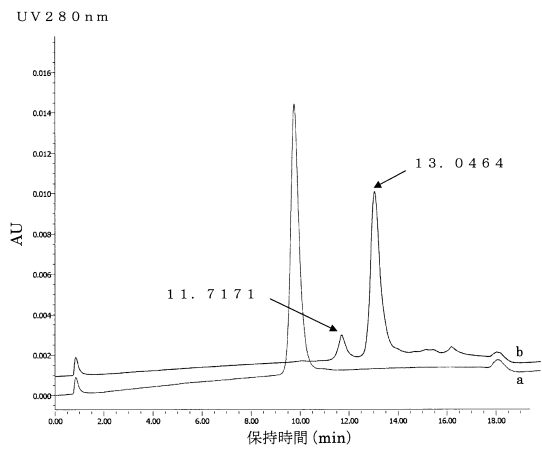
【 3 7 】



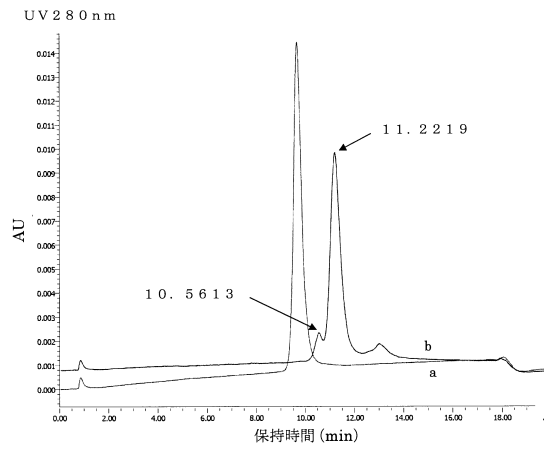
10

20

【 3 8 】



【 3 9 】

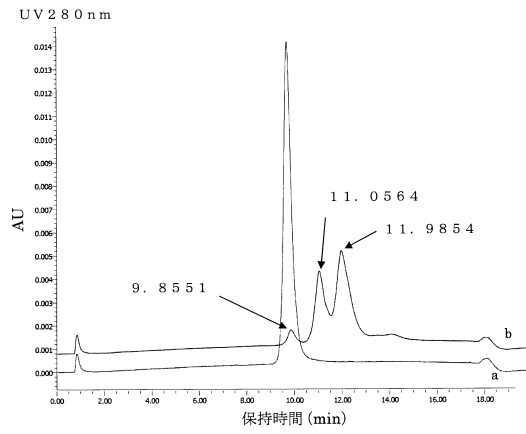


30

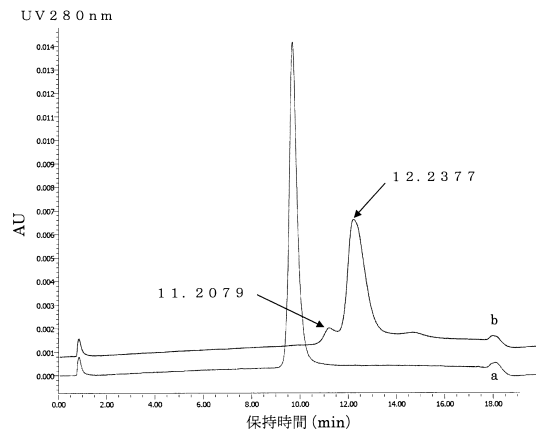
40

50

【 4 0 】



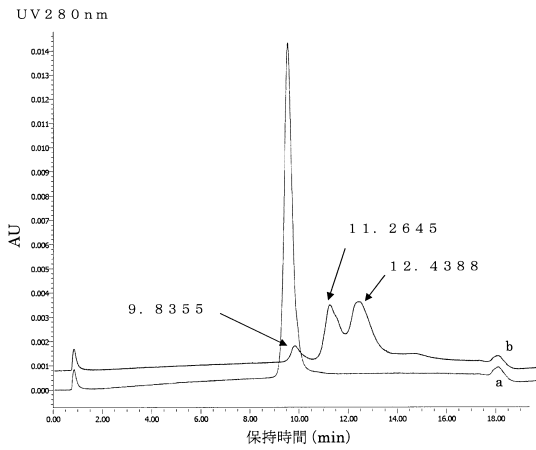
【 4 1 】



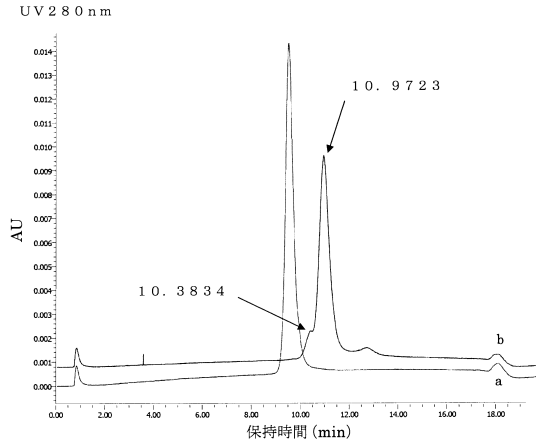
10

20

【 4 2 】



【 4 3 】

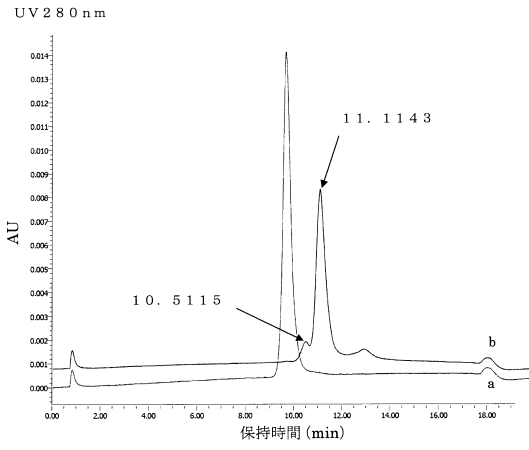


30

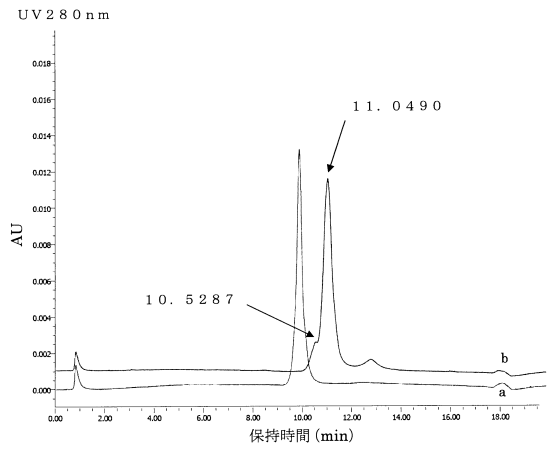
40

50

【 4 4 】



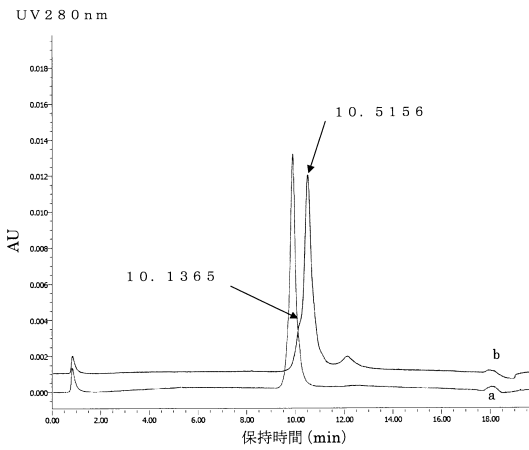
【 4 5 】



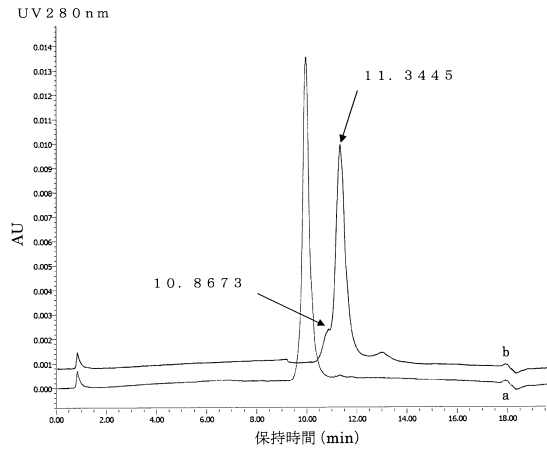
10

20

【 4 6 】



【 4 7 】

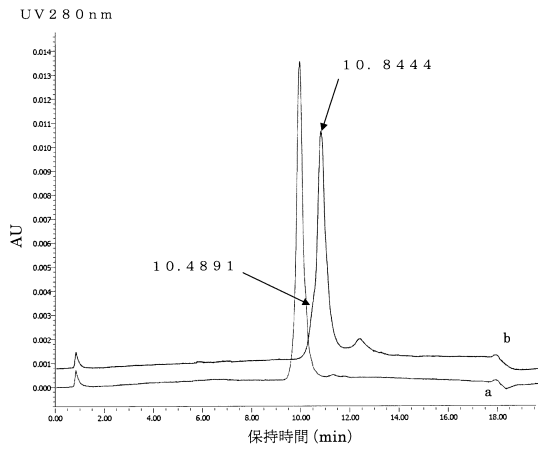


30

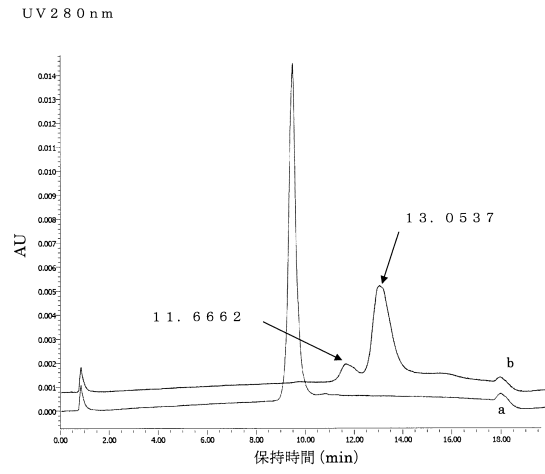
40

50

【 48 】



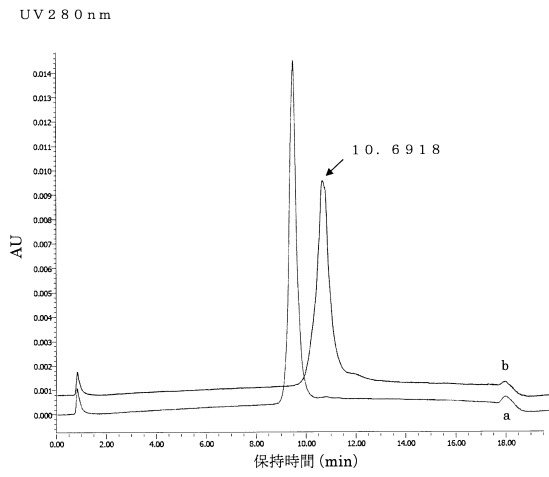
【 49 】



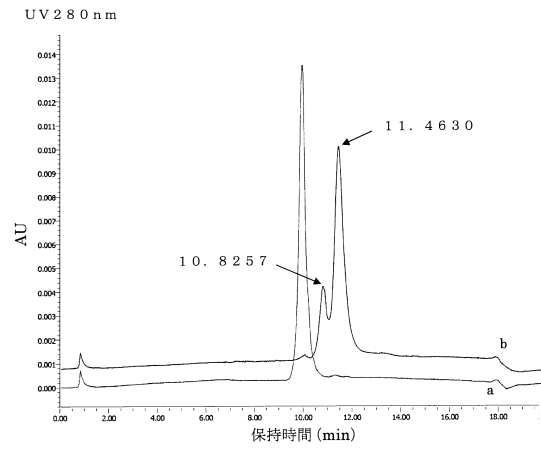
10

20

【 50 】



【 51 】



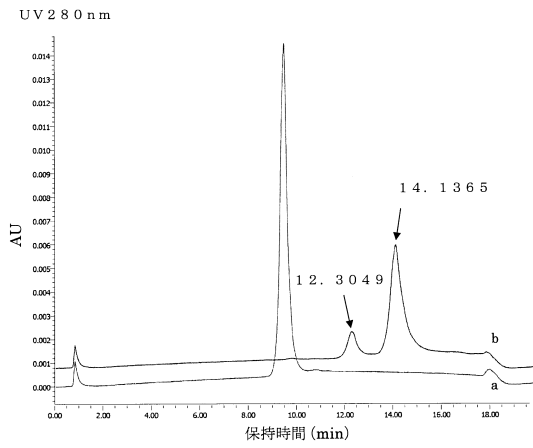
30

40

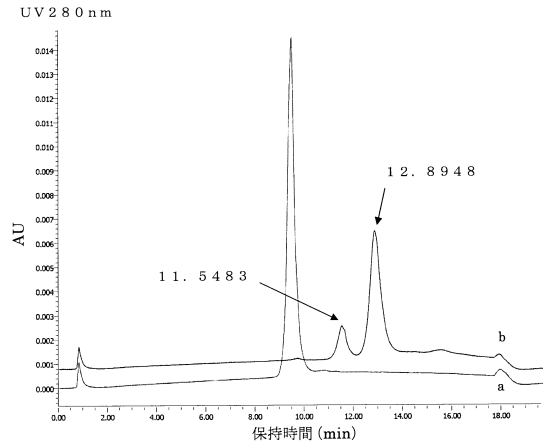
50



【 5 2 】



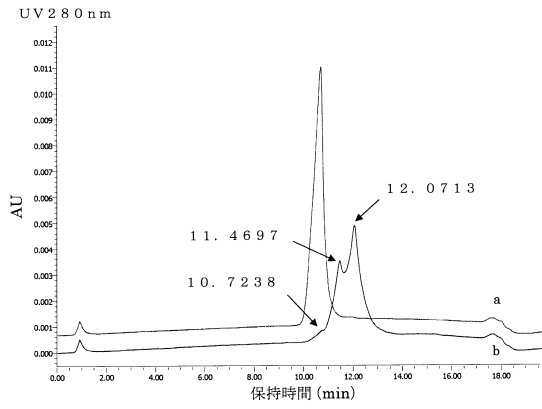
【 5 3 】



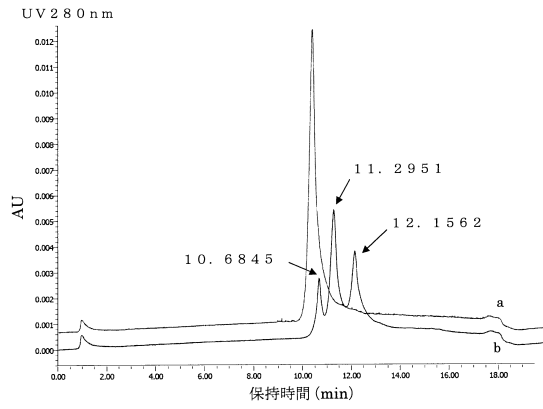
10

20

【 5 4 】



【 5 5 】

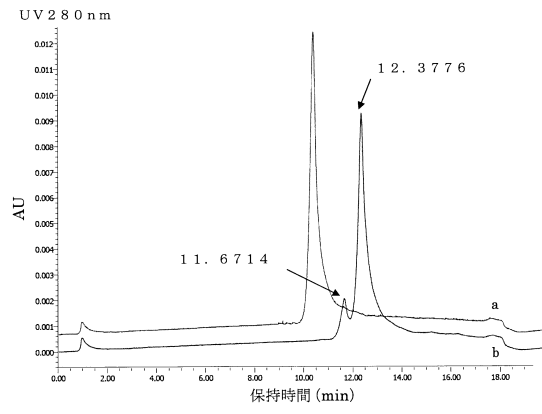


30

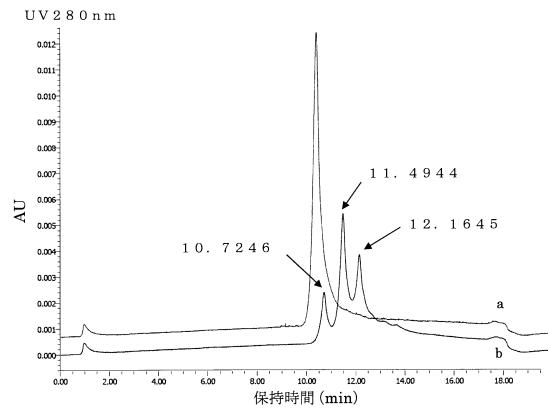
40

50

【 5 6 】



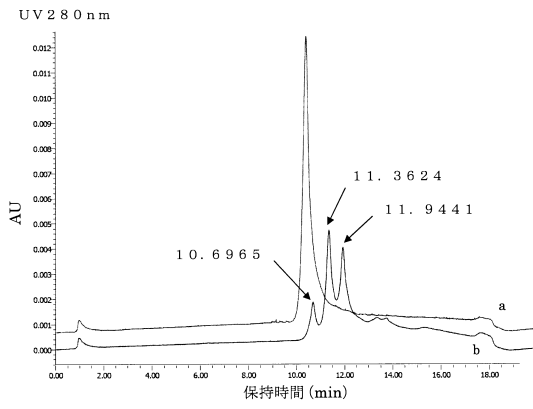
【 5 7 】



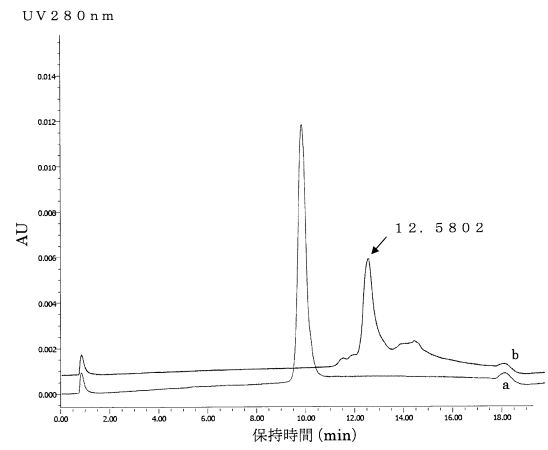
10

20

【 5 8 】



【 5 9 】

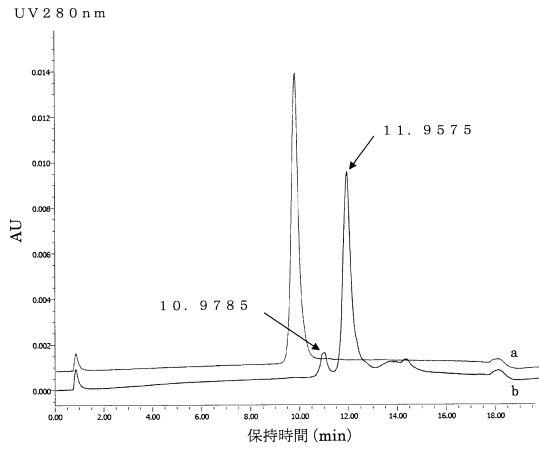


30

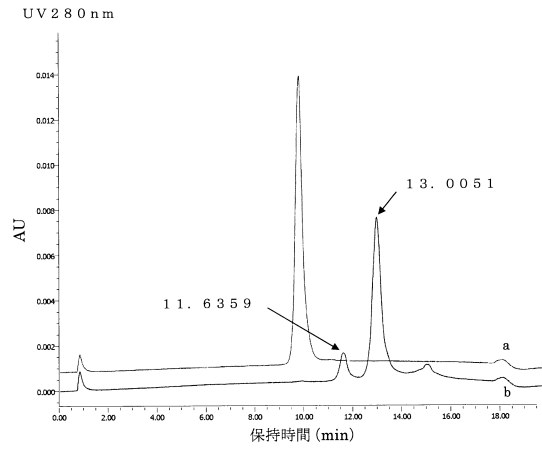
40

50

【 図 6 0 】



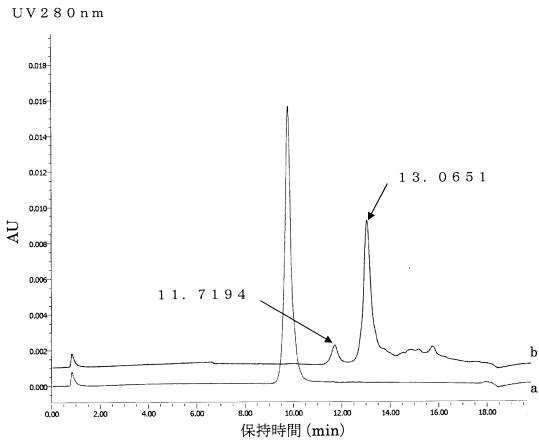
【 図 6 1 】



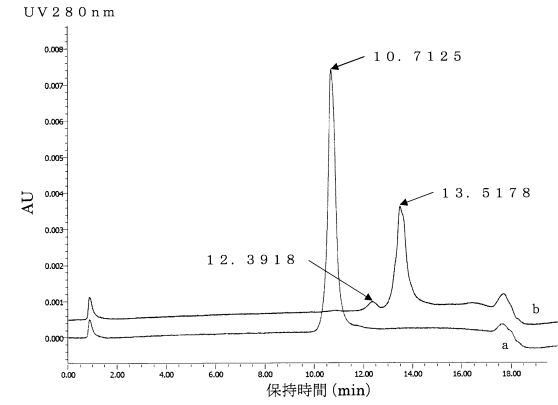
10

20

【 図 6 2 】



【 図 6 3 】

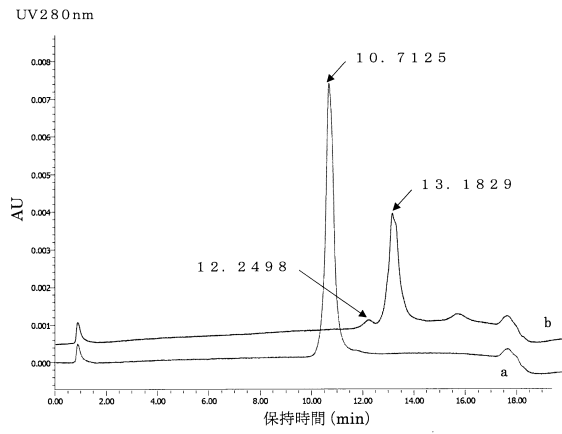


30

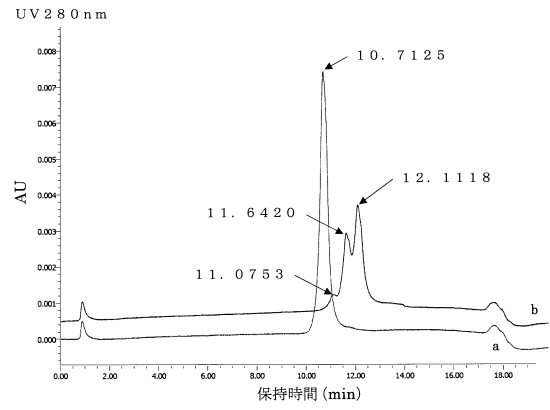
40

50

【 6 4 】



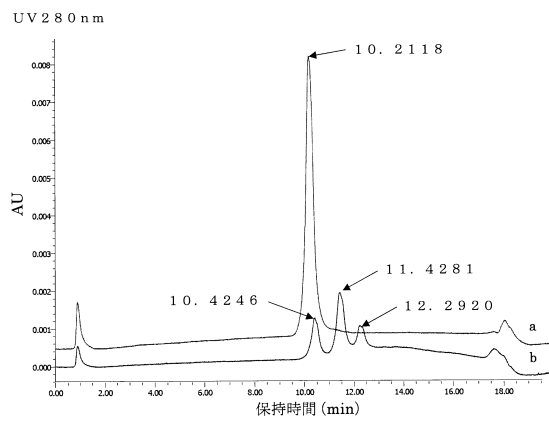
【 6 5 】



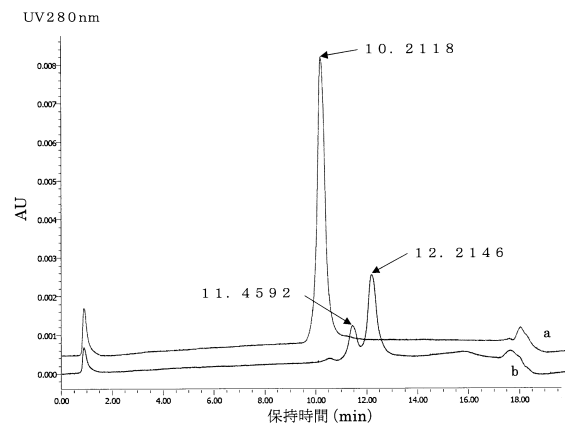
10

20

【 6 6 】



【 6 7 】

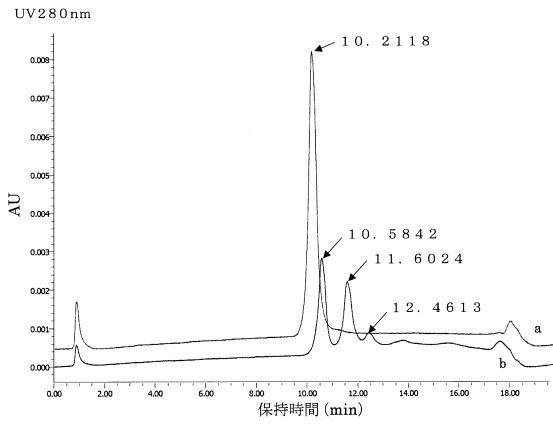


30

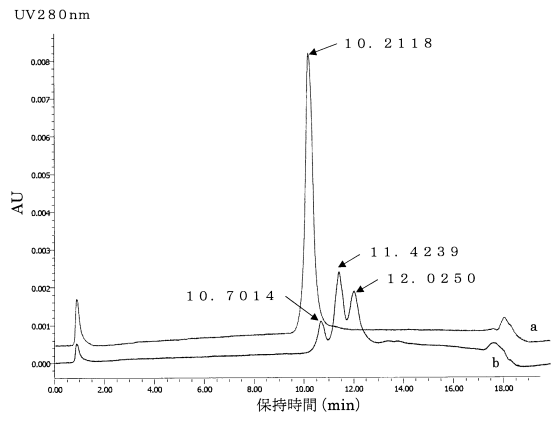
40

50

【 図 6 8 】



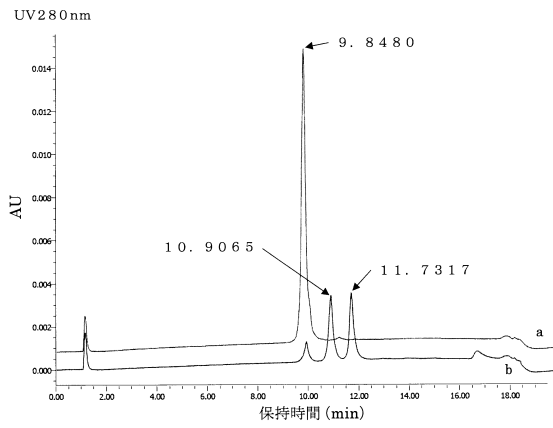
【 図 6 9 】



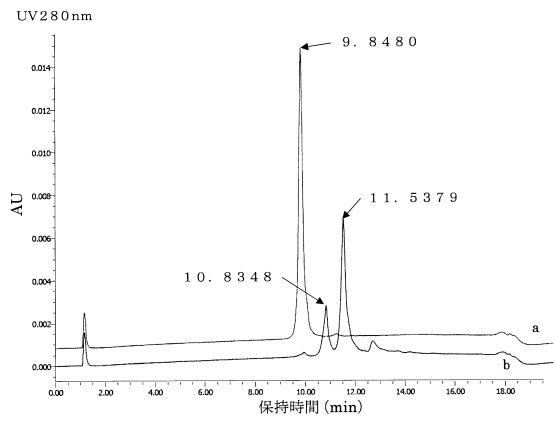
10

20

【 図 7 0 】



【 図 7 1 】

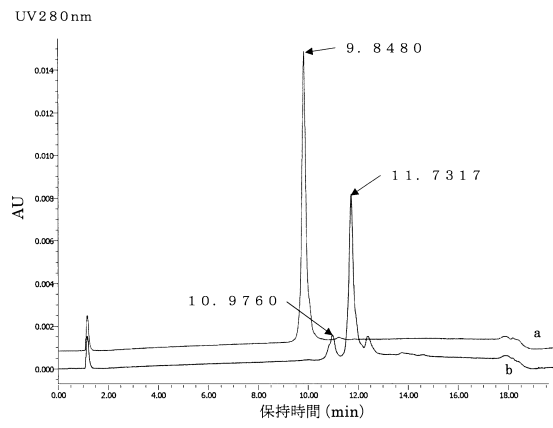


30

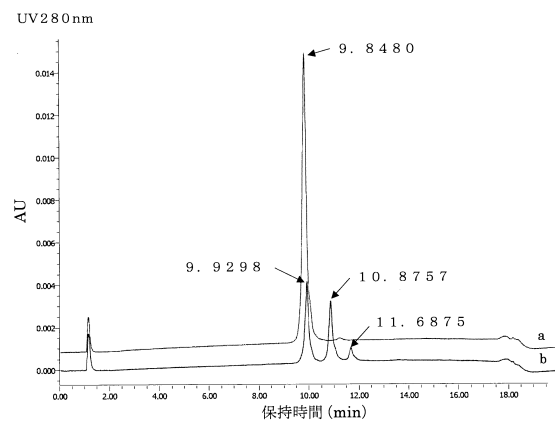
40

50

【 7 2 】



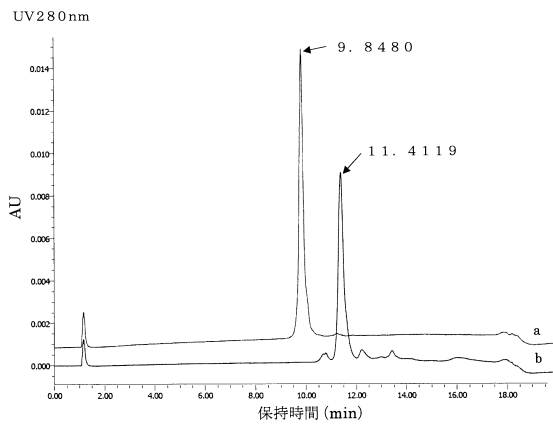
【 7 3 】



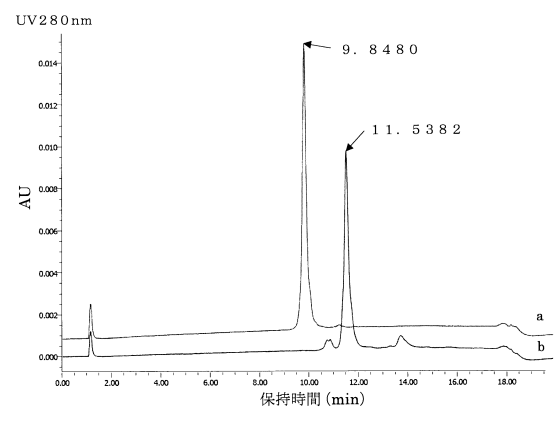
10

20

【 7 4 】



【 7 5 】

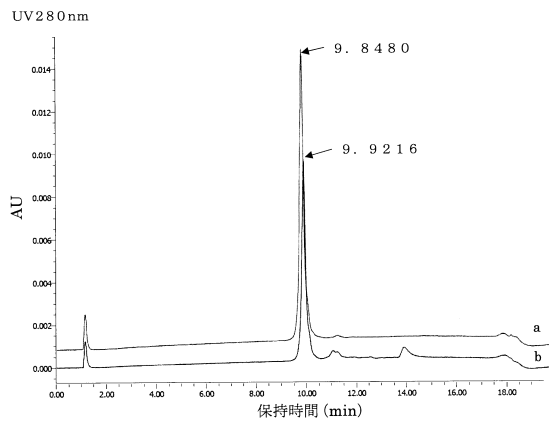


30

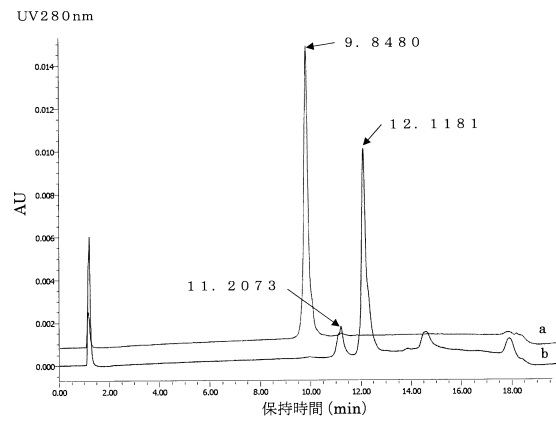
40

50

【 図 7 6 】



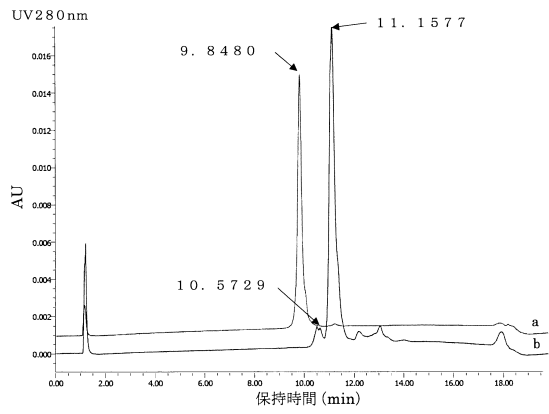
【 図 7 7 】



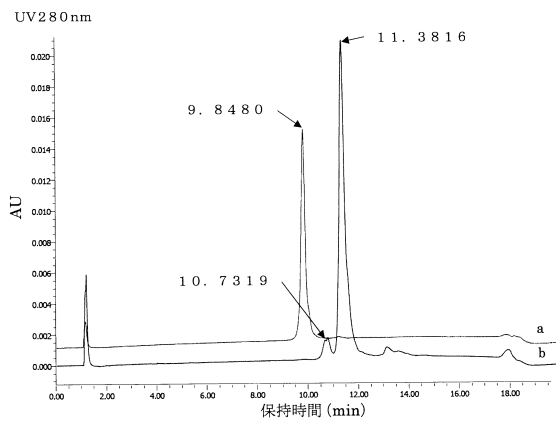
10

20

【 図 7 8 】



【 図 7 9 】

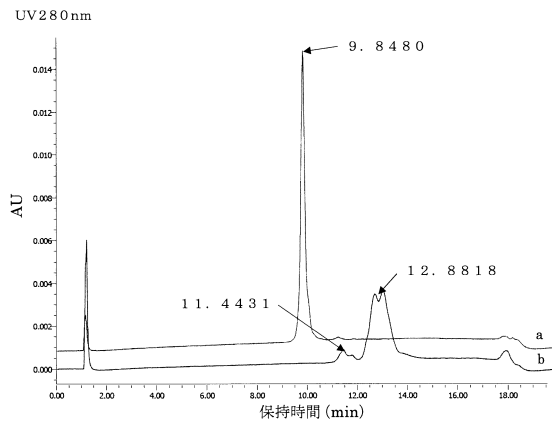


30

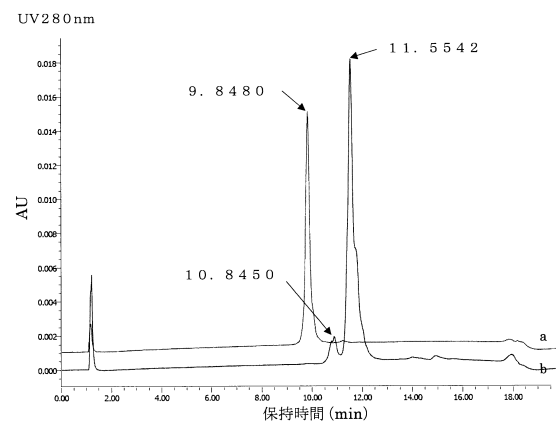
40

50

【 8 0 】



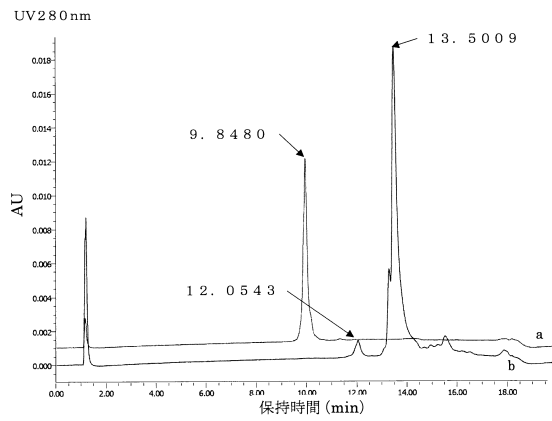
【 8 1 】



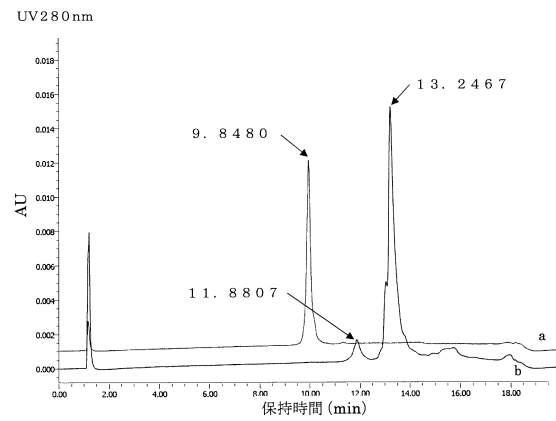
10

20

【 8 2 】



【 8 3 】



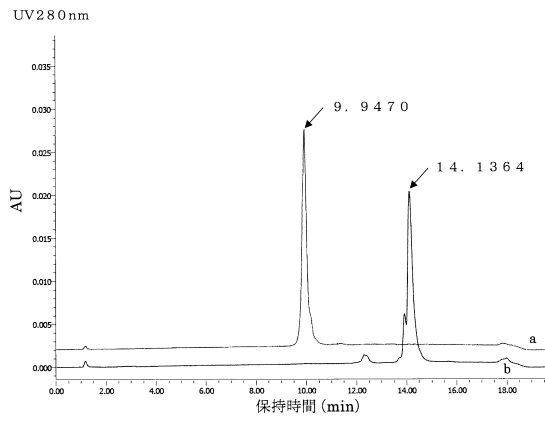
30

40

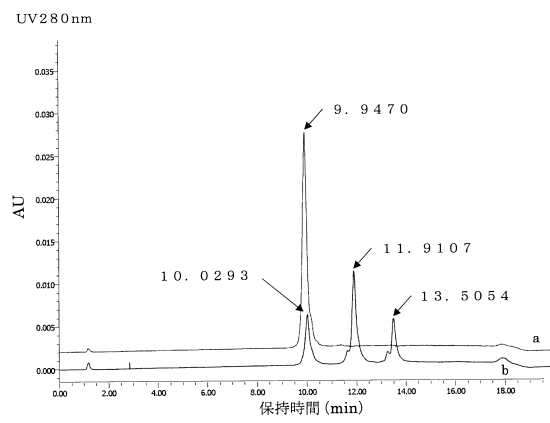
50



【 8 4 】



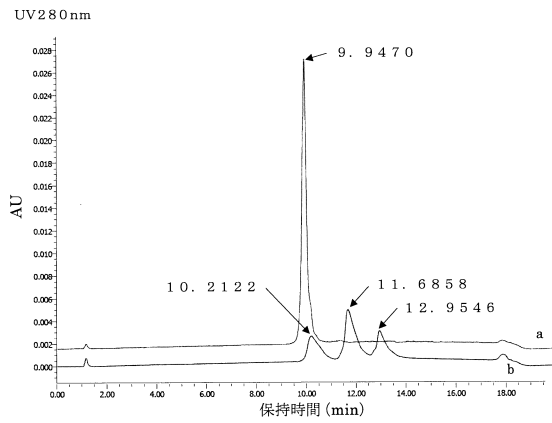
【 8 5 】



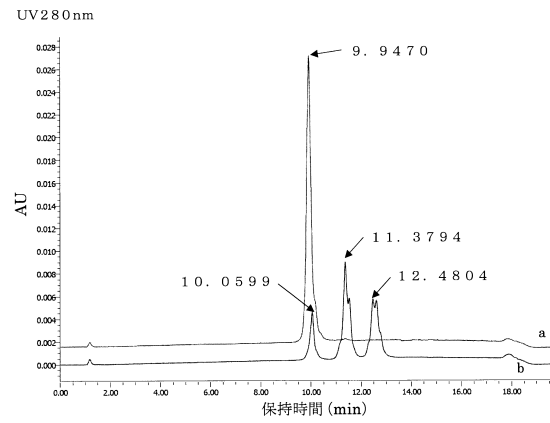
10

20

【 8 6 】



【 8 7 】

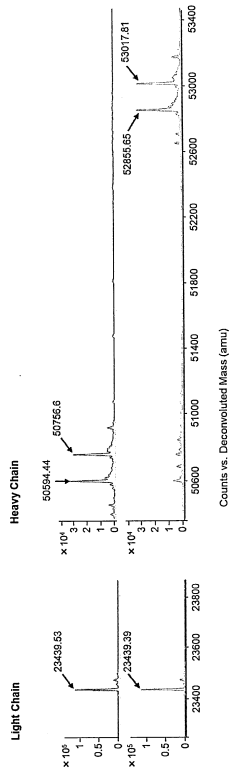


30

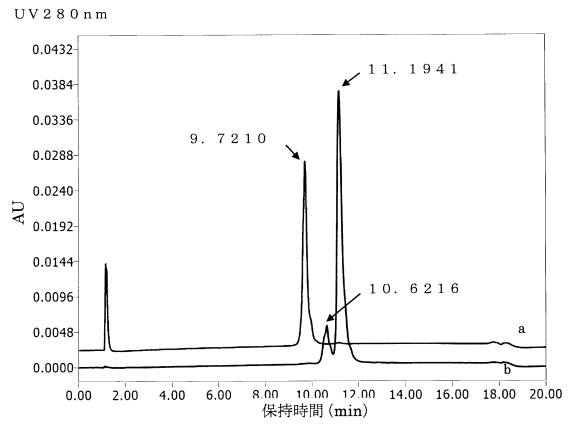
40

50

【 8 8 】



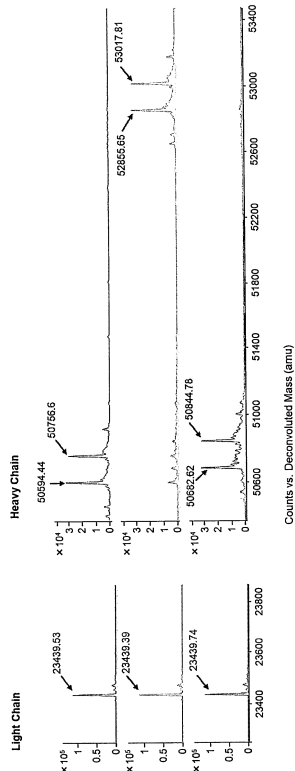
【 8 9 】



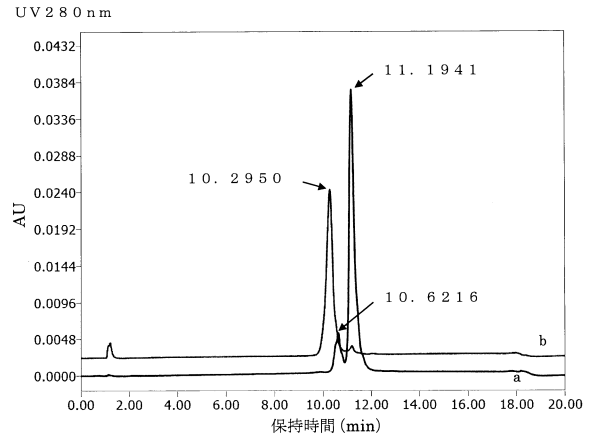
10

20

【 9 0 】



【 9 1 】

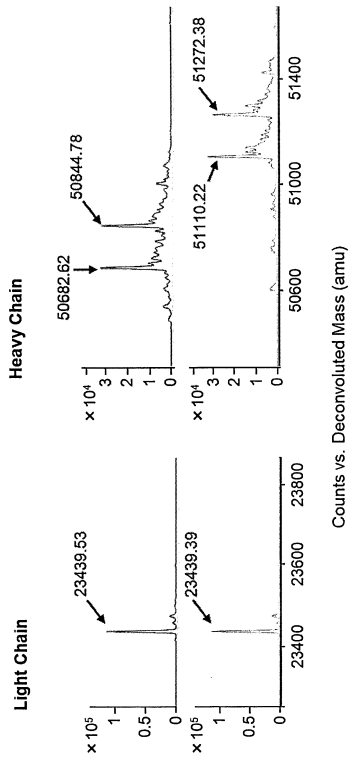


30

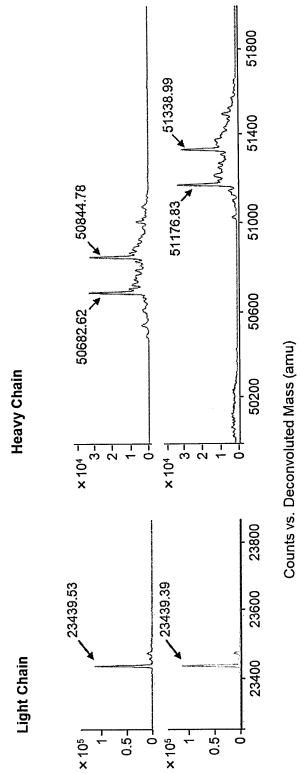
40

50

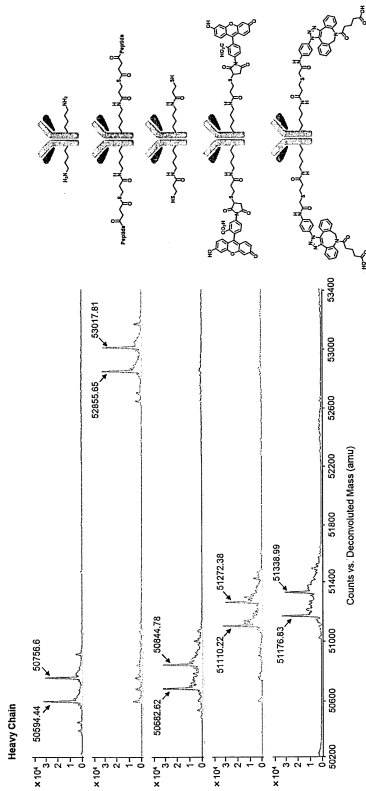
【 9 2 】



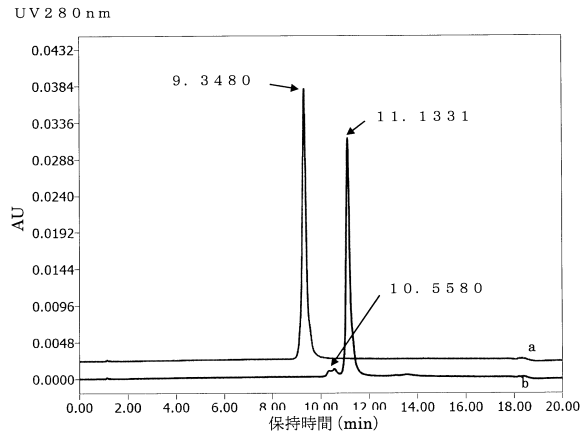
【 9 3 】



【 9 4 】



【 9 5 】



10

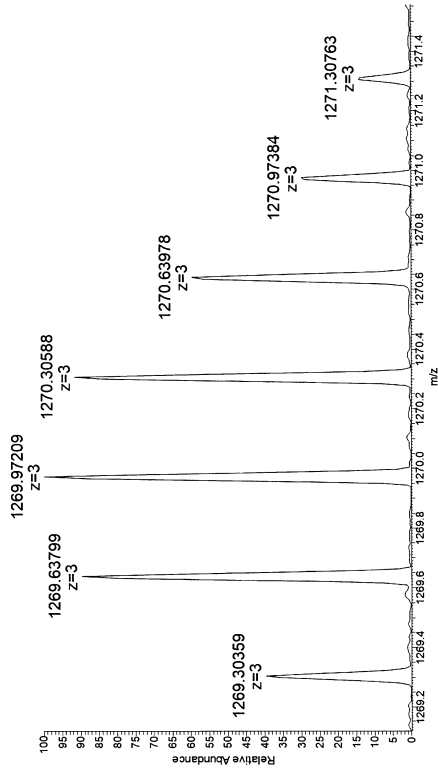
20

30

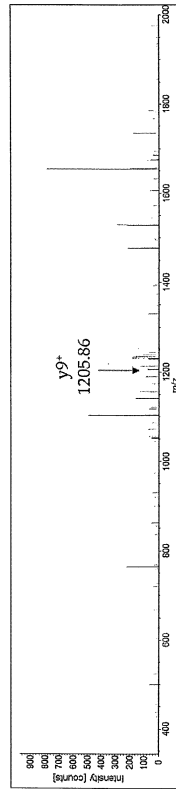
40

50

【 図 9 6 】



【 図 9 7 - 1 】

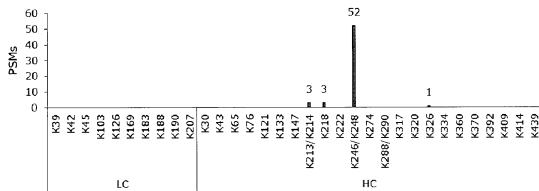


10

20

【 図 9 7 - 2 】

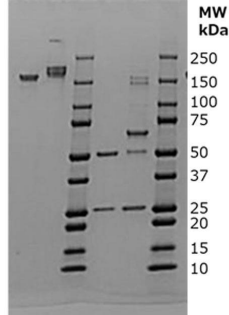
トラスツズマブのチオフェノール活性化体によるチオール導入体  
Proteome Discoverer解析結果



【 図 9 8 】

抗体-核酸コンジュゲートのSDS-PAGE分析

L1 L2 L3 L4 L5 L6



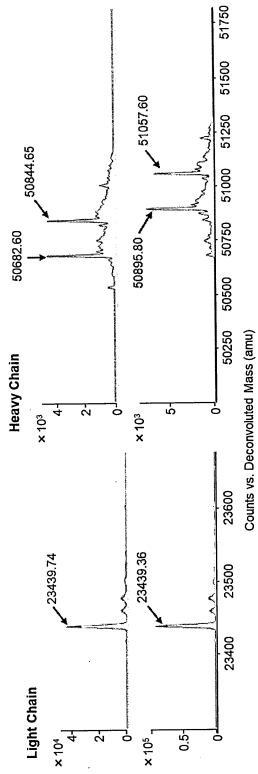
- L1: トラスツズマブ (非還元)
- L2: 抗体-核酸コンジュゲート (非還元)
- L3: スタンダード
- L4: トラスツズマブ (還元)
- L5: 抗体-核酸コンジュゲート (還元)
- L6: スタンダード

30

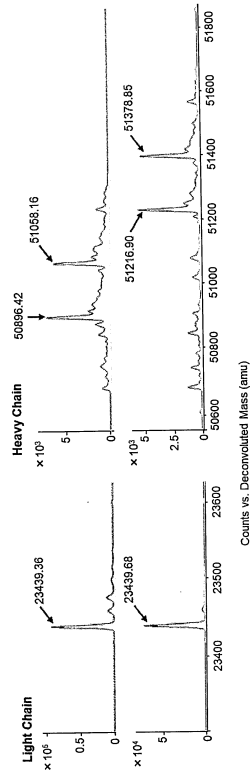
40

50

【 9 9 】



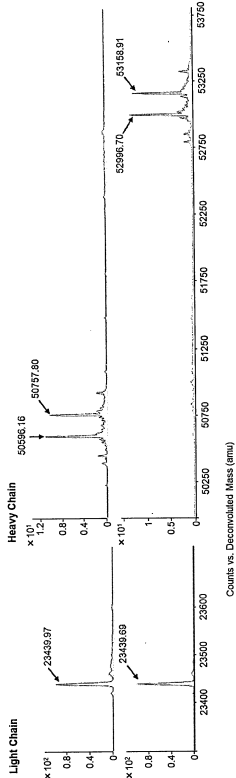
【 1 0 0 】



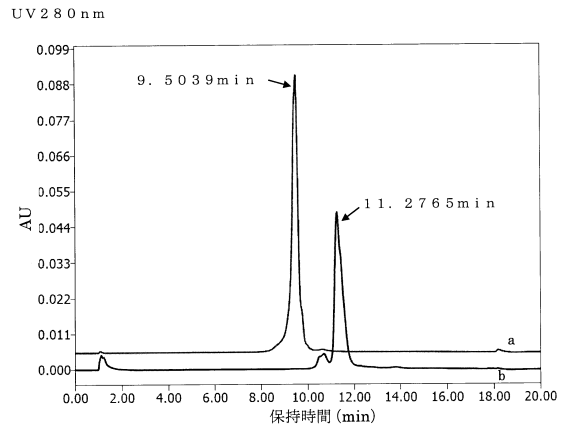
10

20

【 1 0 1 】



【 1 0 2 】

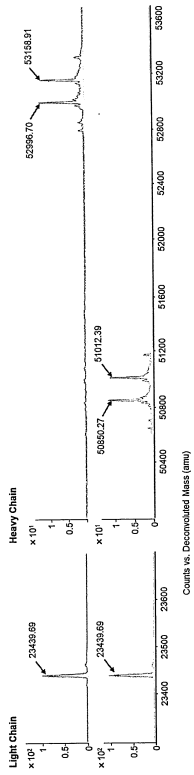


30

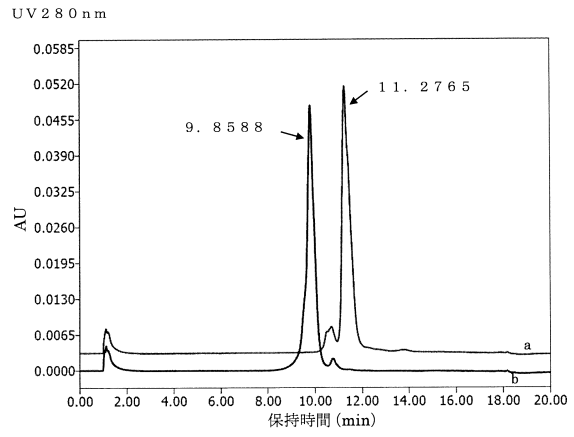
40

50

【 103 】



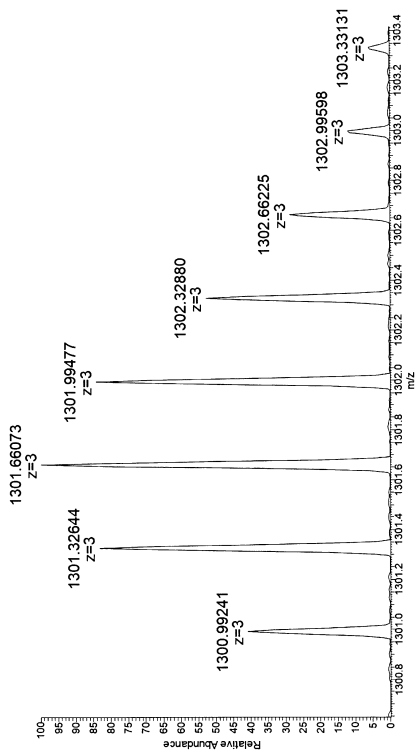
【 104 】



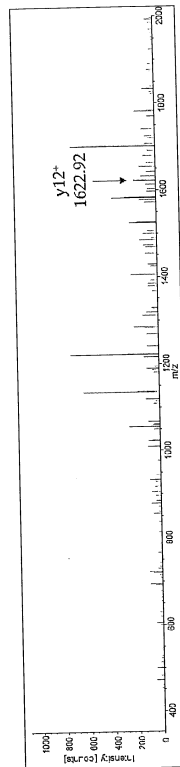
10

20

【 105 】




【 106 - 1 】

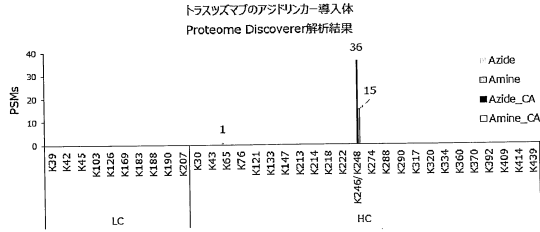



30

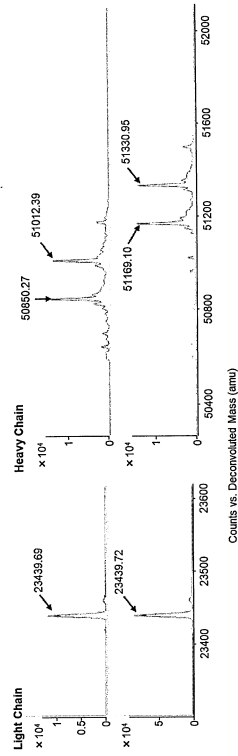
40

50

【 106 - 2】




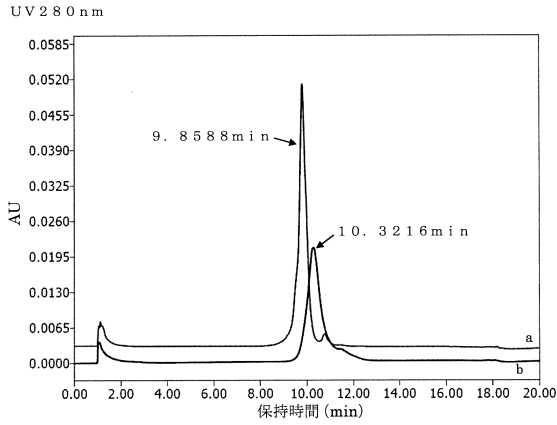
【 107】




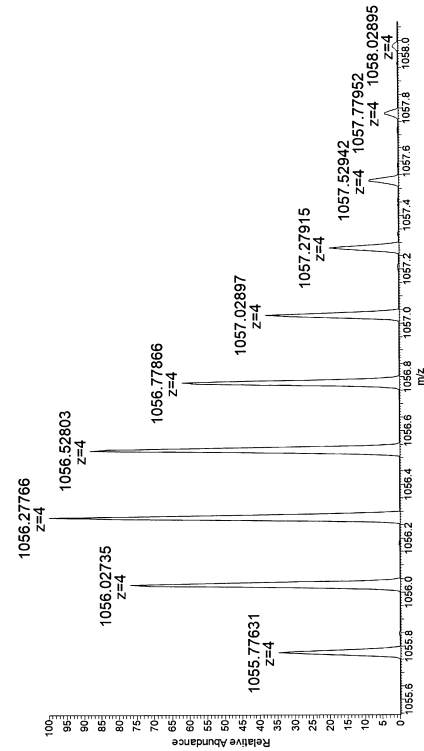
10

20

【 108】



【 109】

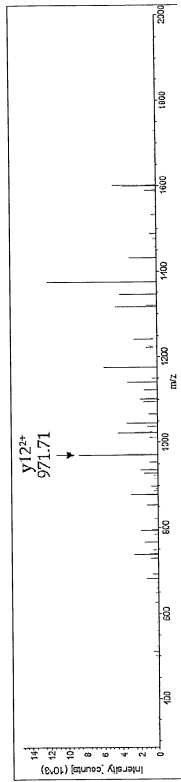


30

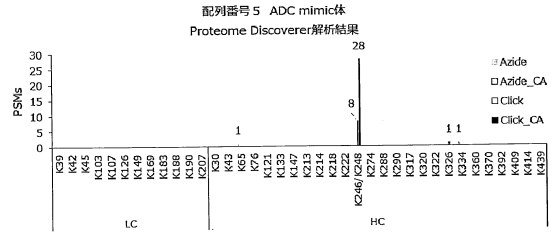
40

50

【 1 1 0 - 1 】



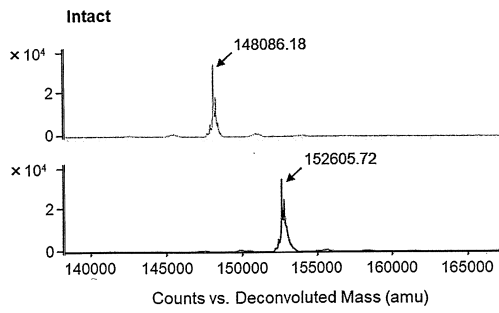
【 1 1 0 - 2 】



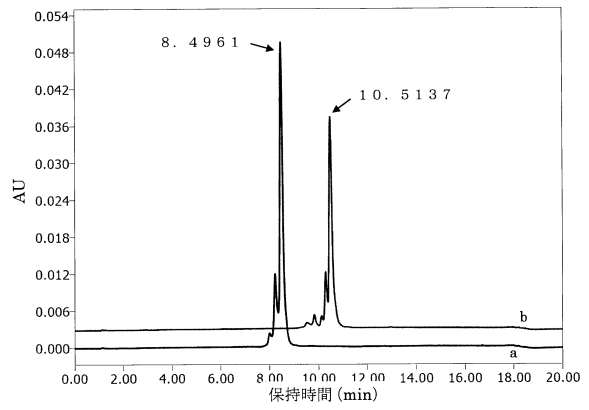
10

20

【 1 1 1 】



【 1 1 2 】



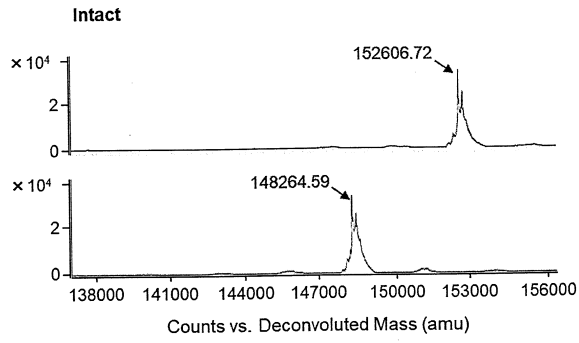
30

40

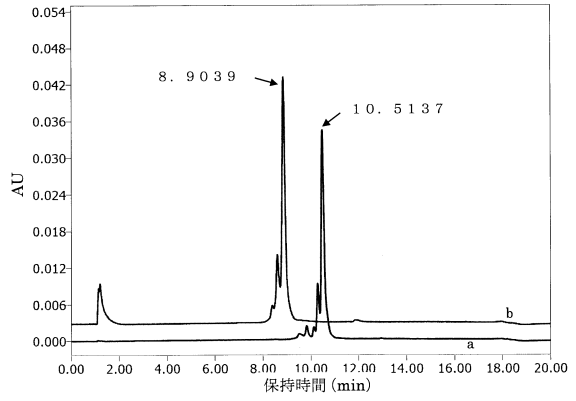
50



【 1 1 3 】



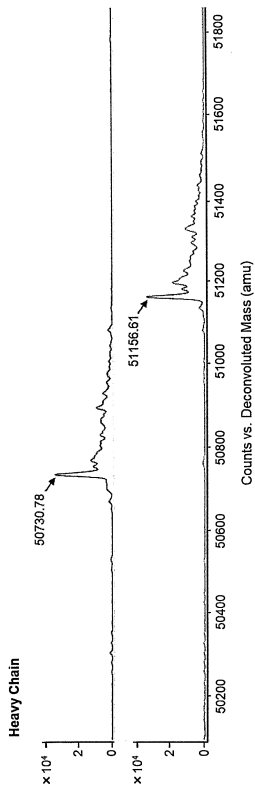
【 1 1 4 】



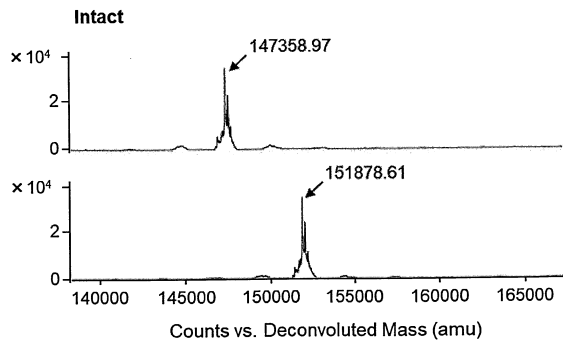
10

20

【 1 1 5 】



【 1 1 6 】

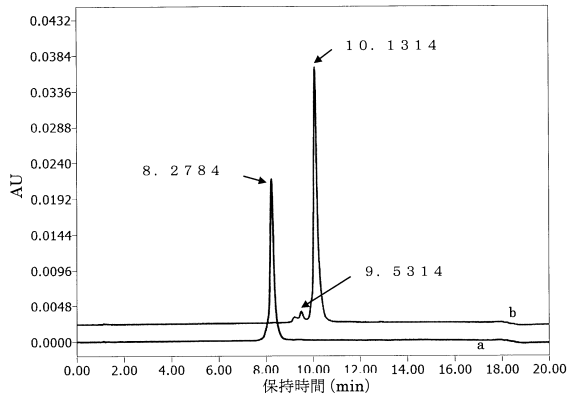


30

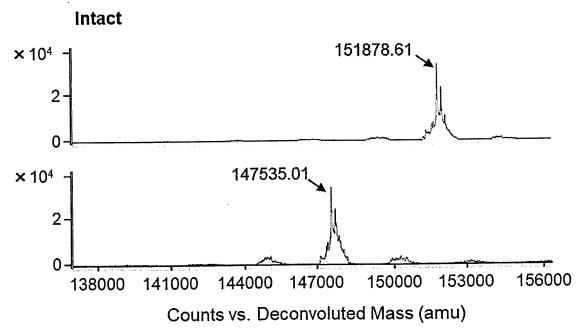
40

50

【 1 1 7 】



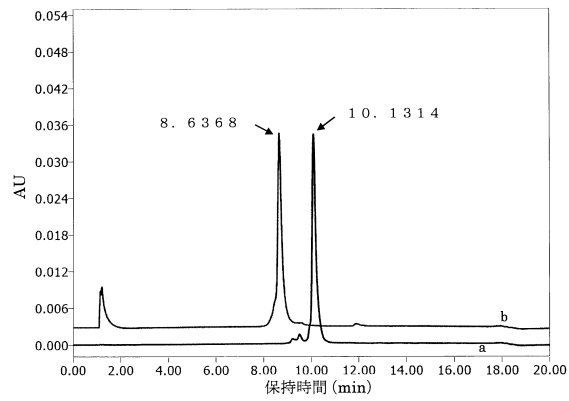
【 1 1 8 】



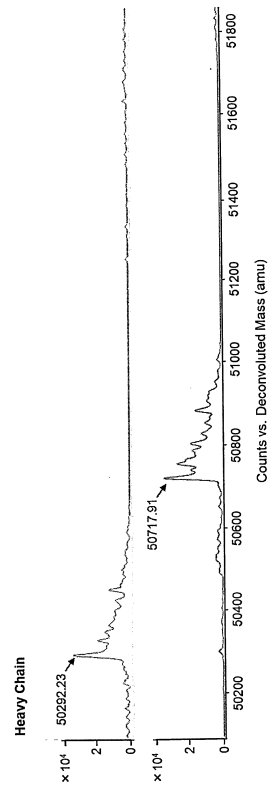
10

20

【 1 1 9 】



【 1 2 0 】

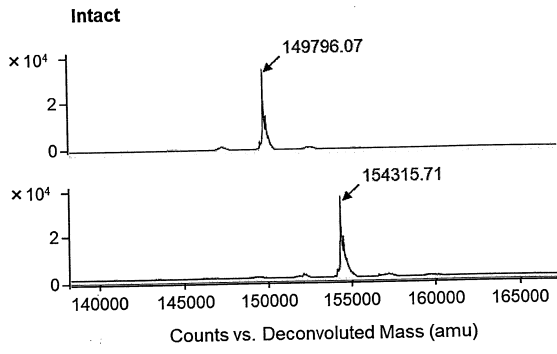


30

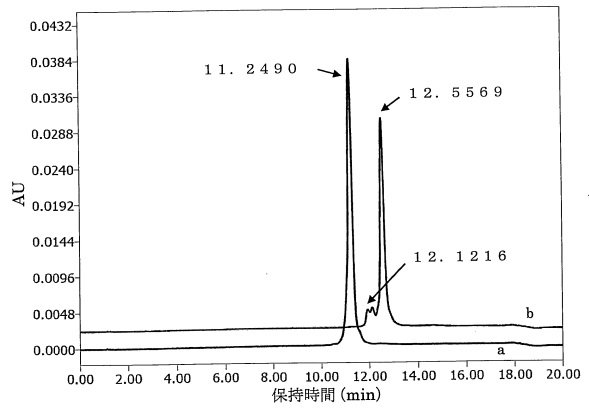
40

50

【 図 1 2 1 】



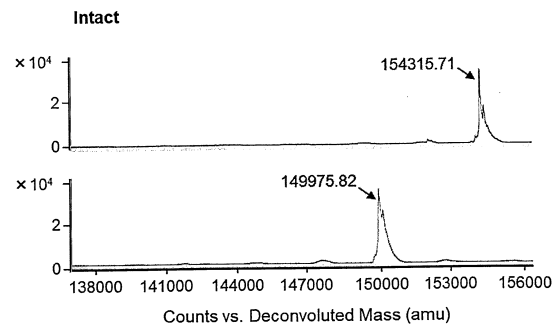
【 図 1 2 2 】



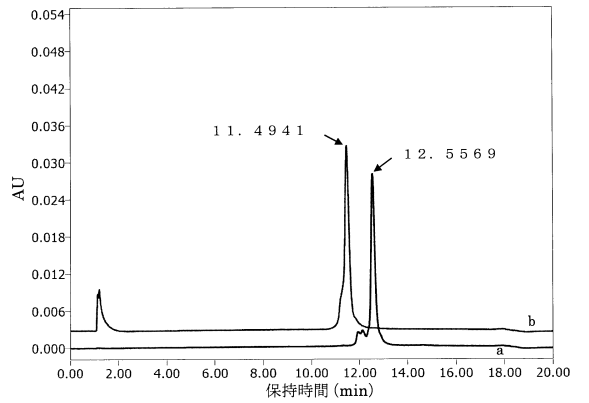
10

20

【 図 1 2 3 】



【 図 1 2 4 】

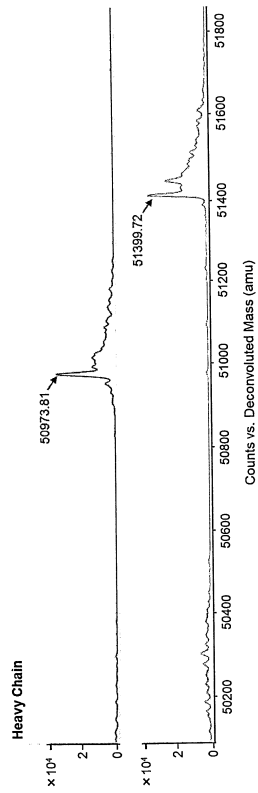


30

40

50

【 1 2 5】



10

20

【配列表】

0007413999000001.app

30

40

50

---

フロントページの続き

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 国際公開第2016/086206(WO, A1)  
国際公開第2017/217347(WO, A1)  
国際公開第2017/191817(WO, A1)  
伊東祐二 他, 抗体部位特異的修飾法を用いた放射性医薬品の開発, Isotope News, 2018年  
02月, 2月号, No.755, p.22-24
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C07K 1/00 - 19/00  
C12N 15/00 - 15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)