(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年11月1日(01.11.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/199337 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/017345

(22) 国際出願日： 2018年4月27日(27.04.2018)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2017-090679 2017年4月28日(28.04.2017) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (**AJINOMOTO CO., INC.**) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 山田 慧 (**YAMADA, Kei**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 松田 豊 (**MATSUDA, Yutaka**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 藤井 友博 (**FUJII, Tomohiro**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 敷田 奈都紀 (**SHIKIDA, Natsuki**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 湯地 玲子 (**YUJI, Reiko**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 新保 和高 (**SHIMBO, Kazutaka**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 伊東 祐二 (**ITO, Yuji**); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許事務所 (**SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE**); 〒1000013 東京都千代田区霞が関３丁目８番１号 虎の門三井ビルディング Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) **Title:** COMPOUND HAVING SUBSTANCE THAT HAS AFFINITY FOR SOLUBLE PROTEIN, CLEAVABLE MOIETY, AND REACTIVE GROUP, OR SALT THEREOF

(54) 発明の名称: 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またはその塩

(57) **Abstract:** The present invention provides a technique that enables modification of a soluble protein, particularly regioselective modification of a soluble protein. More specifically, the present invention provides a compound having a substance that has affinity for a soluble protein, a cleavable moiety, and a reactive group, the compound being represented by formula (I): A-L-B-R [in the formula, A is a substance that has affinity for a soluble protein, L is a cleavable linker that is a divalent group containing a cleavable moiety, B is (a) a divalent group containing a bioorthogonal functional group or (b) a divalent group not containing a bioorthogonal functional group, and R is a group that is reactive to the soluble protein], or a salt thereof.

(57) 要約：本発明は、可溶性タンパク質の修飾、特に、可溶性タンパク質の位置選択的な修飾を可能にする技術を提供する。より具体的には、本発明は、下記式（Ｉ）：Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ （Ｉ） 〔式中、Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩を提供する。

Exhibit 1008
AJINOMOTO CO., INC.
IPR2025-00283

WO 2018/199337 A1

ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

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またはその塩

技術分野

[0001] 本発明は、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　Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ：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、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅ社およびＲｏｃｈｅ社が共同開発したＴ－ＤＭ１（商品名：カドサイラ（登録商標））がある（非特許文献１～３）。

[0003] Ｔ－ＤＭ１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Ｌｙｓ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（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、Ｃ－ＣＡＰ（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％（ＤＡＲ１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）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第２０１６／１８６２０６号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｒｅｉｃｈｅｒｔ ＪＭ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００５；２３：１０７３－８

非特許文献2：Ｋｕｂｏｔａ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ ２

００９；１００：１５６６－７２

非特許文献3：Ｗｕ ＡＭ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００５；２３：１１３７－４６

非特許文献4：Ｊｕｎｕｔｕｌａ ＪＲ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００８；２６：９２５－３２

非特許文献5：Ｓｈｅｎ ＢＱ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１２；３０：１８４－９

非特許文献6：Ｈｏｆｅｒ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２００９；４８：１２０４７－５７

非特許文献7：Ｌｉｕ Ｗ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２００７；４：２３９－４４

非特許文献8：Ｓ．Ｔ．Ｌａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００８；３２０，６６４

非特許文献9：Ａ．Ｅ．Ｓｐｅｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ ２００４；５，４１

非特許文献10：Ｙ．Ｔａｋａｏｋａ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ． ２０１３；５２，４０８８

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、可溶性タンパク質の修飾、特に、可溶性タンパク質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）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および（２）その可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質（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うことができる。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。

[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、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またはその塩、ならびに当該化合物またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬を提供する。

〔１〕下記式（Ｉ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ　　（Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩。

〔２〕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、〔１〕の化合物またはその塩。

〔３〕Ｌが前記（ｉ）の切断性リンカーである、〔２〕の化合物またはその塩。

〔４〕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、〔２〕または〔３〕の化合物またはその塩。

〔５〕Ｌが前記（ｉｉ）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、〔２〕の化合物またはその塩。

〔６〕可溶性タンパク質に対する親和性物質がペプチドである、〔１〕～〔５〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔７〕ペプチドが、モノクローナル抗体のＦｃ領域に対する結合性ペプチドである、〔６〕の化合物またはその塩。

〔８〕結合性ペプチドが、ＩｇＧのＦｃ領域に対する結合性ペプチドである、〔７〕の化合物またはその塩。

〔９〕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、〔１〕～〔８〕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〕結合性ペプチドが、下記式（ｉ）：

(X_{1-3})－Ｃ－(X_{2})－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－

Ｗ－Ｃ－（Ｘ$_{1-3}$）　（配列番号９４）　（ｉ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕

によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔９〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１１〕結合性ペプチドが、下記式（ｉ－１）：

（Ｘ$_{1-3}$）－Ｃ－（Ｘ$_{2}$）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘ$_{1-3}$）　（配列番号９５）　（ｉ－１）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、又はジアミノプロピオン酸残基で

あり、

Ｇはグリシン残基であり、

Ｘａａ２はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

Ｌはロイシン残基であり、

Ｖはバリン残基であり、かつ

Ｗはトリプトファン残基である。〕

によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔９〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１２〕結合性ペプチドが、下記式（ｉ－２）：

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９６）　（ｉ－２）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、グルタミン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ、

Ｗは、トリプトファン残基である。〕によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔１０〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１３〕結合性ペプチドが、下記式（ｖ）：

（X_{1-3}）－Ｃ－（Ｘａａ３）－（ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）（配列番号１０２）　（ｖ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔１２〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１４〕結合性ペプチドは、下記式（ｖｉ）：

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）　（配列

番号１０３）　　（ｖｉ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、１３～１５アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔１３〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１５〕結合性ペプチドが、下記式（ｖｉｉ）：

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－Ｔ　（配列番号１０４）　　（ｖｉｉ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、かつ

Ｔは、スレオニン残基である〕で表される、１３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔１４〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１６〕結合性ペプチドが、下記式（ｖｉｉｉ）：

Ｒ－Ｇ－Ｎ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）

（配列番号１０５）　（ｖｉｉｉ）

〔式中、

Ｒは、アルギニン残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｎは、アスパラギン残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、１３～１５アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔１３〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１７〕結合性ペプチドが、ヒトＩｇＧと結合可能であることを特徴とする、〔７〕～〔１６〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１８〕結合性ペプチドが、（ａ）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号９２）のアミノ酸配列において、いずれかのアミノ酸残基が、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基からなる群より選ばれる１つのアミノ酸残基により置換されており、かつ

（ｂ）配列番号９２の前記アミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、親和性ペプチドまたはその塩である、〔７〕～〔９〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１９〕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〕～〔１８〕のいずれかの化合物またはその塩。

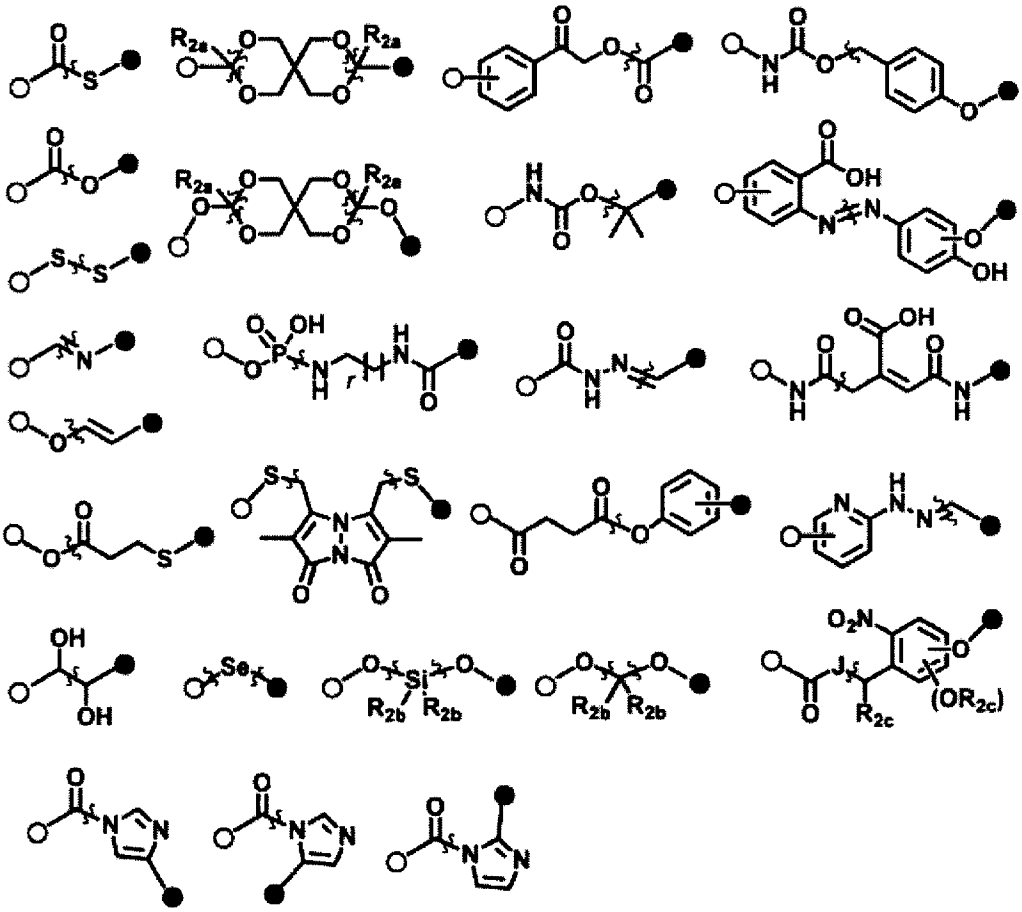
〔２０〕前記切断性部分が、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、〔１〕～〔１９〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２１〕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、〔２〕～〔２０〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２２〕前記（ｉｉ）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、〔２〕～〔２０〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２３〕切断性部分が、下記：

[化1]



〔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、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（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。）；

（ｖｉ）NR_dR_e-、$NR_dR_e-C(=O)-$、$NR_dR_e-C(=O)-O-$、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。）；または

（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

からなる群より選ばれ、

Ｊは、－ＣＨ$_2$－、－Ｏ－、または－Ｓ－であり、

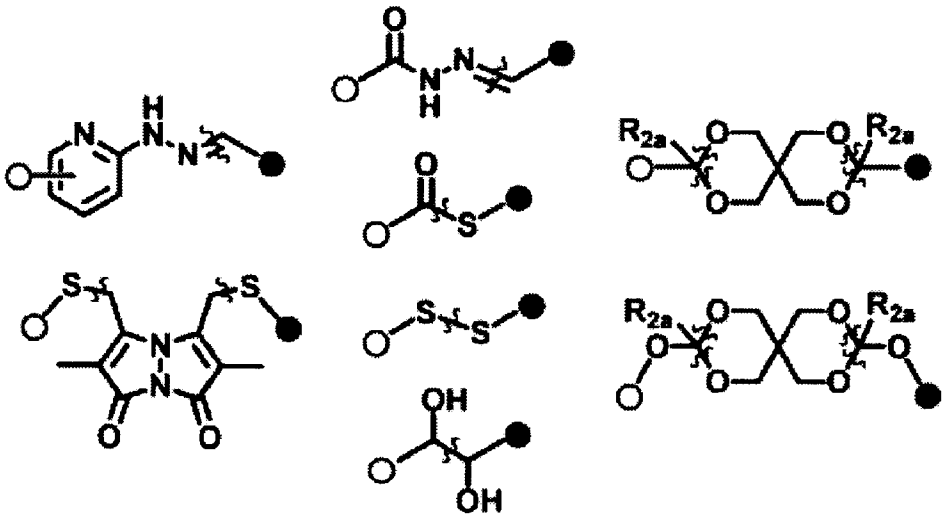
ｒは、１～４の任意の整数であり、

○（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、●がＡに対する結合を示し、○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〕～〔２０〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２４〕前記（ｉ）の切断性部分が、以下：

[化2]



〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

Ｒ$_{2a}$は、〔２３〕と同じであり、

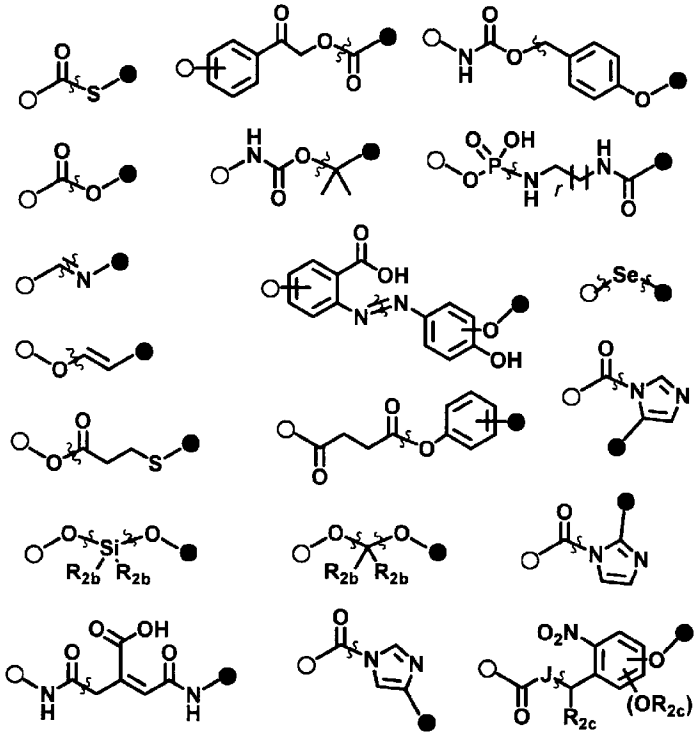
○（白丸）はＡに対する結合を示し、●（黒丸）はＢに対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がＡに対する結合を示し、○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、〔２〕～〔１９〕、〔２１〕、〔２３〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２５〕前記（ｉｉ）の切断性部分が、以下：

[化3]



〔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、●がＡに対する結合を示し、○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、〔２〕～〔１９〕、〔２２〕、〔２３〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２６〕Ｌが、下記式（Ｌ１）～（Ｌ３）：

Ｌａ－Ｃ－Ｌｂ　　（Ｌ１）

Ｌａ－Ｃ　　（Ｌ２）

Ｃ－Ｌｂ　　（Ｌ３）

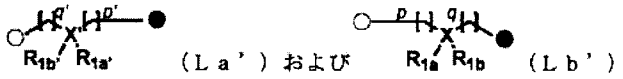
〔式中、

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。〕のいずれか一つで表される、〔１〕～〔２５〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２７〕前記ＬａおよびＬｂが、それぞれ、下記（Ｌａ’）および（Ｌｂ’）：

[化4]



（Ｌａ’）および　（Ｌｂ’）

〔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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$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、〔２６〕の化合物またはその塩。

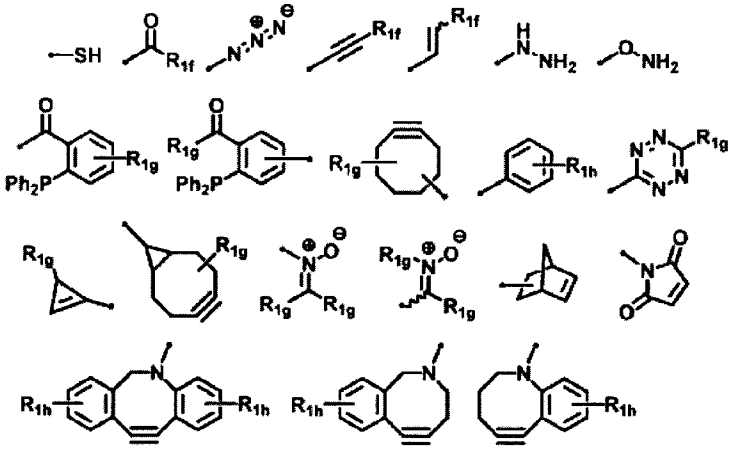
〔２８〕生体直交性官能基を含む２価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、α－ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より

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〕～〔２７〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２９〕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、α－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〕～〔２７〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３０〕生体直交性官能基が、下記：

[化5]



〔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、

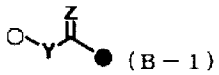
・は、結合手である。）で表されるいずれか一つである、〔１〕～〔２９〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３１〕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$_a$－（Ｒ$_a$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〕～〔３０〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３２〕Ｂが、下記式（Ｂ－１）：

[化6]



（Ｂ－１）

〔式中、

Ｙは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または下記式（Ｂ－２）：

[化7]



（Ｂ－２）

（式中、

ＶおよびＶ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または単結合であり、

Ｖ１は、生体直交性官能基を含む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$_2$－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〕～〔３１〕のいずれかの化合物またはその塩。

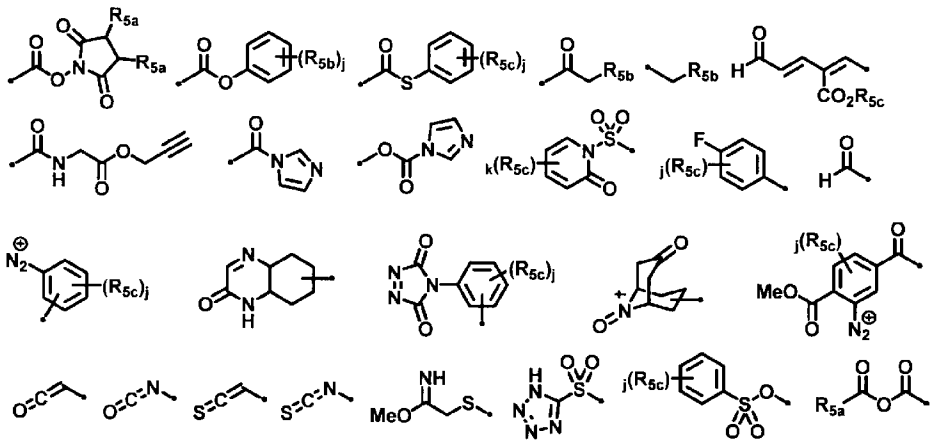
〔３３〕反応性基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基である、〔１〕～〔３２

〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３４〕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、〔３３〕の化合物またはその塩。

〔３５〕反応性基が、下記：

[化8]



〔ここで、

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

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。〕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〕～〔３４〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３６〕ＡおよびＲを連結する主鎖の原子数が４～２０個である、〔１〕～〔３５〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３７〕ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、〔１〕～〔３６〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３８〕Ｌ－Ｂで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔１〕～〔３７〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔３９〕前記式（Ｉ）で表される化合物が、下記（Ｉ’）：

Ａ－Ｂ２－Ｌ’－Ｂ１－Ｒ　　（Ｉ’）

〔式中、

ＡおよびＲは、前記式（Ｉ）のものと同じであり

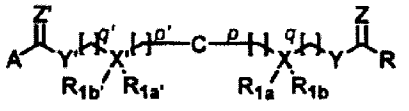
Ｌ’は、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーであり、

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。〕で表される化合物である、〔１〕～〔３８〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔４０〕前記式（Ｉ’）で表される化合物が、下記（Ｉ’’）：

[化9]



（Ｉ’’）

〔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’、R_{1a}、$R_{1a'}$、R_{1b}、および$R_{1b'}$は、〔２７〕記載の式（Ｌａ’）および（Ｌｂ’）のものと同じであり、

ＹおよびＹ’は、同一または異なって、〔３２〕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、〔３９〕の化合物またはその塩。

〔４１〕下記式（Ｉ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ　　（Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬。

〔４２〕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。

〔４３〕下記式（Ｉ）：

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む、抗体の位置選択的修飾試薬。

[0013] 第２に、本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法を提供す

る。

（可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩）

〔４４〕下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔４５〕可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔４４〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔４６〕可溶性タンパク質がＩｇＧ抗体である、〔４４〕または〔４５〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔４７〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔４４〕～〔４６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔４８〕可溶性タンパク質が、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抗体である、〔４４〕～〔４７〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩：

（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。

〔４９〕可溶性タンパク質が、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、〔４４〕～〔４８〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔５０〕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、〔４９〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔５１〕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、〔５０〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔５２〕前記標的領域が、（ａ）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、（ｂ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における２８８～２９０位のアミノ酸残基からなる領域、または（ｃ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における３１７位のアミノ酸残基からなる領域である、〔５１〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔５３〕前記位置選択性が５０％以上である、〔４９〕～〔５２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔５４〕前記位置選択性が７０％以上である、〔５３〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔５５〕前記位置選択性が９０％以上である、〔５４〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔５６〕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、〔４９〕～〔５５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔５７〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

Ｔが、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、Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を複数個有する、〔４４〕～〔５６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔５８〕前記可溶性タンパク質が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

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、〔４４〕～〔５７〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

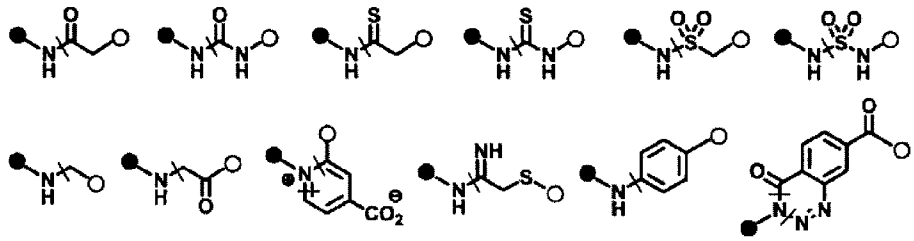
〔５９〕重鎖の個数が２個である、〔５８〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔６０〕可溶性タンパク質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、〔４４〕～〔５９〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６１〕可溶性タンパク質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、〔４４〕～〔６０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６２〕前記反応により生成する部分が、下記：

[化10]



〔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、〔４４〕～〔６１〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６３〕ＡおよびＲ’を連結する主鎖の原子数が４～２０個である、〔４４〕～〔６２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６４〕ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、〔４４〕～〔６３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６５〕Ｌ－Ｂで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔４４〕～〔６４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６６〕前記式（ＩＩ）で表される化合物が、下記（ＩＩ’）：

Ａ－Ｂ２－Ｌ’－Ｂ１－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’およびＴは、前記式（ＩＩ）のものと同じであり

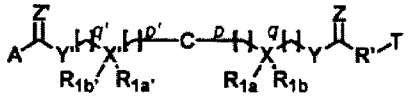
Ｌ’は、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーであり、

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。〕で表される化合物である、〔４４〕～〔６５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６７〕前記式（ＩＩ’）で表される化合物が、下記（ＩＩ’’）：

[化11]



（ＩＩ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’およびＴは、〔４４〕記載の式（ＩＩ）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、０～１０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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は、同一または異なって、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（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。）；

（ｖｉ）NR_dR_e-、$NR_dR_e-C(=O)-$、$NR_dR_e-C(=O)-O-$、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。）；または

（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

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、〔３２〕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、〔６６〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔６８〕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、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、

Ｔは、抗体である。〕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。

[0014]（可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法）

〔６９〕可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（Ｉ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ　　（Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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

合物またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔７０〕可溶性タンパク質が抗体であり、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、〔６９〕の方法。

[0015] 第３に、本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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。

（可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩）

〔７１〕下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対す

る親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩。

〔７２〕可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔７１〕の複合体またはその塩。

〔７３〕可溶性タンパク質がＩｇＧ抗体である、〔７１〕または〔７２〕の複合体またはその塩。

〔７４〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔７１〕～〔７３〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔７５〕可溶性タンパク質が、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抗体である、〔７１〕～〔７４〕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。

〔７６〕可溶性タンパク質が、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’（－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３０％以上の位置選択性で結合している、〔７１〕～〔７５〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔７７〕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、〔７６〕の複合体またはその塩。

〔７８〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

Ｔが、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、Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位を複数個有する、〔７１〕～〔７７〕のいずれかの複合体またはその塩。

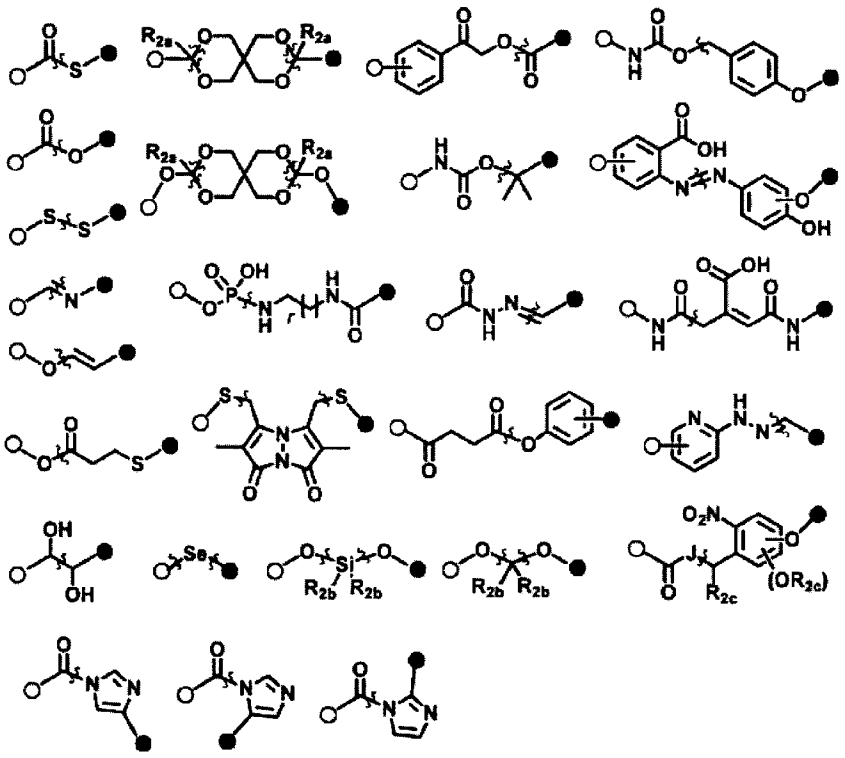
〔７９〕前記可溶性タンパク質が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

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、〔７１〕～〔７８〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８０〕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反応部分を含む２価の基である、〔７１〕～〔７９〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８１〕前記反応により生成する部分が、下記：

[化12]



〔ここで、結合に直交する波線は、反応により生成する結合を示し、

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、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（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。）；

（ｖｉ）NR_dR_e-、$NR_dR_e-C(=O)-$、$NR_dR_e-C(=O)-O-$、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。）；または

（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

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、

○（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。

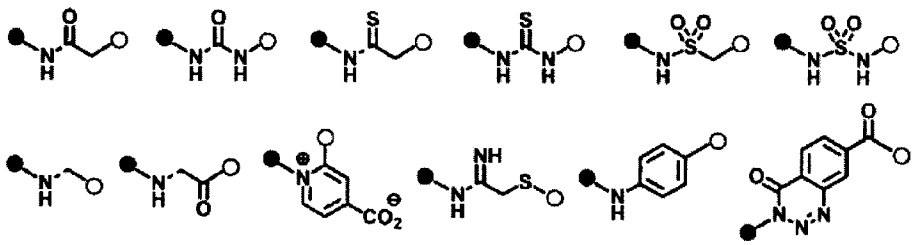
化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がＡに対する結合を示し、○がＢに対する結合を示していてもよい。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔７１〕～〔８０〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８２〕可溶性タンパク質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、〔７１〕～〔８１〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８３〕可溶性タンパク質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、〔７１〕～〔８２〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８４〕前記反応により生成する部分が、下記：

[化13]



〔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、〔７１〕～〔８３〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８５〕機能性物質が薬物または標識物質である、〔７１〕～〔８４〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８６〕機能性物質が低分子化合物である、〔７１〕～〔８５〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８７〕薬物が抗癌剤である、〔８５〕または〔８６〕の複合体またはその塩。

〔８８〕ＡおよびＲ’を連結する主鎖の原子数が４～２０個である、〔７１〕～〔８７〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔８９〕ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、〔７１〕～〔８８〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔９０〕Ｌ－Ｂで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔７１〕～〔８９〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔９１〕前記式（ＩＩＩ）で表される化合物が、下記式（ＩＩＩ’）：

Ａ－Ｂ２’（－Ｆ２）－Ｌ’－Ｂ１’（－Ｆ１）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ’）

〔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、

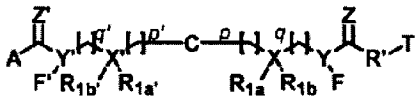
Ｂ１’およびＢ２’は、同一または異なって、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む２価の基であり、

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。〕で表される、〔７１〕～〔９０〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔９２〕前記式（ＩＩＩ’）で表される化合物が、下記（ＩＩＩ’’）：

[化14]



（ＩＩＩ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’およびＴは、〔７１〕記載の式（ＩＩＩ）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、０～１０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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は、同一または異なって、前記（ｉ）～（ｖｉｉ）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、〔３２〕記載の式（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、〔９１〕の複合体またはその塩。

〔９３〕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２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、

Ｔは、抗体である。〕で表される、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。

[0016]（可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法）

〔９４〕可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａ、Ｌ、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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和

性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成することを含む、方法。

〔９５〕可溶性タンパク質が抗体であり、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、〔９４〕の方法。

〔９６〕可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合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、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成することを含む、方法。

[0017] 第４に、本発明は、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質の製造方法を提供する。

〔９７〕生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔９８〕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、〔９７〕の方法。

〔９９〕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、〔９８〕の方法。

〔１００〕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、〔９８〕または〔９９〕の方法。

〔１０１〕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、〔９８〕の方法。

〔１０２〕可溶性タンパク質が抗体であり、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、〔９７〕～〔１０１〕のいずれかの方法。

〔１０３〕生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒは、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[0018] 第５に、本発明は、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

〔１０４〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、あるいは

下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔１０５〕前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔１０４〕の方法。

〔１０６〕前記生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を、１種または２種の機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ２）：

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔１０４〕の方法。

〔１０７〕可溶性タンパク質が抗体であり、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、〔１０４〕～〔１０６〕のいずれかの方法。

〔１０８〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

（Ａ）下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａ、Ｌ、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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔１０９〕機能性物質を有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔１１０〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

（Ａ）下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を、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）

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔１１１〕機能性物質を有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒは、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を、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）

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[0019] 第６に、本発明は、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法を提供する。

（生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩）

〔１〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、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、かつ

生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔２〕下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔３〕可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔１〕または〔２〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔４〕可溶性タンパク質がＩｇＧ抗体である、〔１〕～〔３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔５〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔１〕～〔４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６〕可溶性タンパク質が、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抗体である、〔１〕～〔５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩：

（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。

〔７〕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、〔１〕～〔６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔８〕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、〔１〕～〔７〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔９〕前記標的領域が、（ａ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における２４６～２４

８位のアミノ酸残基からなる領域、（ｂ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における２８８～２９０位のアミノ酸残基からなる領域、または（ｃ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における３１７位のアミノ酸残基からなる領域である、〔８〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１０〕前記位置選択性が５０％以上である、〔１〕～〔９〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１１〕前記位置選択性が７０％以上である、〔１０〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１２〕前記位置選択性が９０％以上である、〔１１〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１３〕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、〔１〕～〔１２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１４〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

多量体タンパク質に含まれる複数の単量体タンパク質中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において生体直交性官能基を有する結果、前記多量体タンパク質が複数の生体直交性官能基を有する、〔１〕、〔３〕～〔１３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１５〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において生体直交性官能基を有する結果、抗体が複数の生体直交性官能基を有する、〔１〕、〔３〕～〔１４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１６〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タ

ンパク質であり、

Ｔが、複数の単量体タンパク質中の対応する複数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、多量体タンパク質がＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を複数有する、〔２〕～〔１３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１７〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

Ｔが、複数の重鎖中の対応する複数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、抗体がＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を複数有する、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１８〕重鎖の個数が２個である、〔１５〕または〔１７〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１９〕Ｌ１が、下記式（Ｌ１－１）～（Ｌ１－２）：

Ｃ１－Ｌｂ　　（Ｌ１－１）

Ｃ１　　（Ｌ１－２）

〔式中、

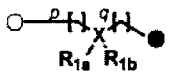
Ｌｂは、２価の基であり、

Ｃ１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。〕

のいずれか一つで表される、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔１８〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２０〕前記Ｌｂが、下記式（Ｌｂ’）：

[化15]



（Ｌｂ’）

〔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。

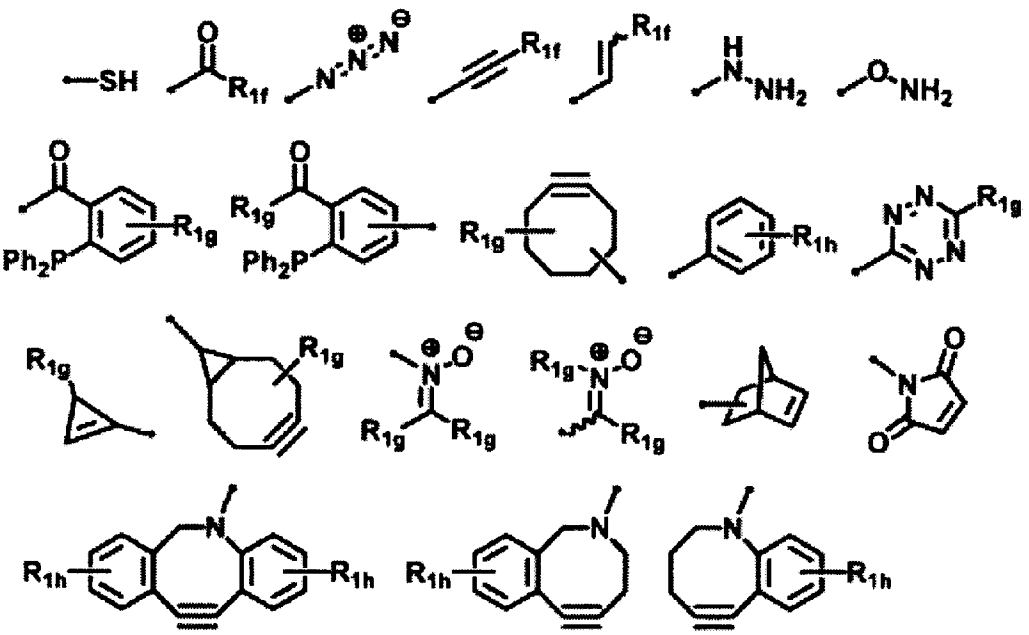
〇（白丸）は、Ｃ１に対する結合を示し、●（黒丸）はＢに対する結合を示す。〕で表される、〔１９〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔２１〕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、チオエステル基、α－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〕～〔２０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔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、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、α－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〕～〔２０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２３〕生体直交性官能基が、下記：

[化16]



〔式中、

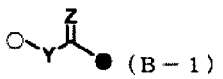
R_{1f}、単一もしくは複数のR_{1g}および単一もしくは複数のR_{1h}は、同一もしくは異なって、前記（ｉ）～（ｖｉｉ）からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。）で表されるいずれか一つである、〔１〕～〔２２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２４〕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_a－（R_a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、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔２３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２５〕Ｂが、下記式（Ｂ－１）：

[化17]

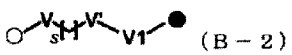


（Ｂ－１）

〔式中、

Ｙは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－CH_2－、または下記式（Ｂ－２）：

[化18]



（Ｂ－２）

（式中、

ＶおよびＶ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－CH_2－、または単結合であり、

Ｖ１は、生体直交性官能基を含む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_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、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔２４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２６〕生体直交性官能基が、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を介して可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔２５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

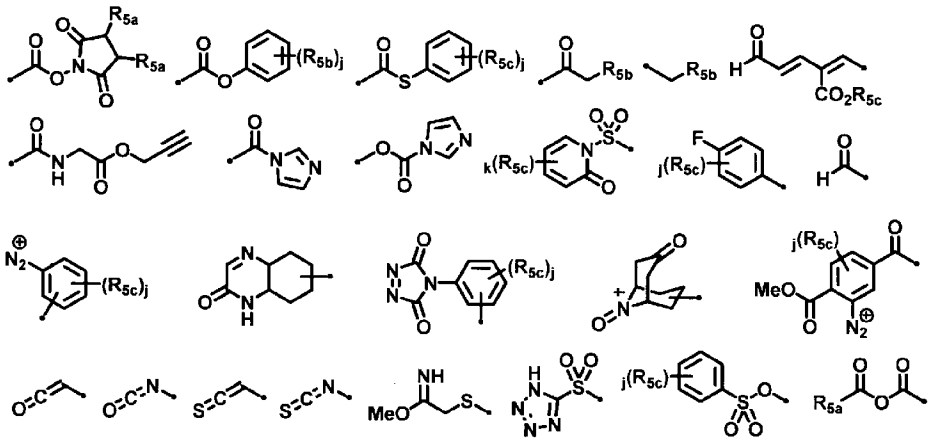
〔２７〕生体直交性官能基が、リジン残基の側鎖を介して可溶性タンパク質に結合している、〔２６〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔２８〕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、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔２６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２９〕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〕～〔１３〕、〔１６〕～〔２８〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３０〕反応性基が、下記：

[化19]



〔ここで、

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

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。〕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、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔２９〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３１〕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が２～１０個であるリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔３０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３２〕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が環構造を含まないリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔３１〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３３〕Ｌ１末端部分およびR’を連結する主鎖の原子数が２～１０個である、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔３２〕のいずれかの可溶性タンパク質

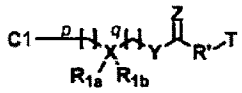
またはその塩。

〔３４〕ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔３３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３５〕Ｌ１－Ｂで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔３４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３６〕前記式（ＩＶ）で表される可溶性タンパク質が、下記（ＩＶ’）：

[化20]



（ＩＶ’）

〔式中、

Ｃ１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。

ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}およびR_{1b}は、前記式（Ｌｂ’）のものと同じであり、

ＹおよびＺは、前記のものと同じであり、

Ｒ’およびＴは、前記式（ＩＶ）のものと同じである。〕で表される、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔３５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３７〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、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、かつ

生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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おり、

生体直交性官能基がリジン残基の側鎖を介して可溶性タンパク質に結合しており、

可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において生体直交性官能基を有する結果、抗体が複数の生体直交性官能基を有する、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔３８〕下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、

Ｔは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

[0020]（生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法）

本発明はまた、上記〔１〕～〔３８〕の可溶性タンパク質のうち、式（ＩＶ）またはその下位の式による特定を要する、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

〔３９〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはそ

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、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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、かつ

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク

質またはその塩を生成することを含む、方法。

[0021] 好ましくは、上記〔３９〕の方法は、以下であってもよい。

〔４０〕可溶性タンパク質が抗体であり、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、〔３９〕の方法。

〔４１〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒは、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質（ここで、可溶性タンパク質は、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。）と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表され、かつ

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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、かつ

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[0022] 第７に、本発明は、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法を提供する。

（機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩）

〔１〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、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、かつ

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔２〕下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつ

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔３〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式（Ｖ１）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ１）

〔式中、

Ｌ１、Ｆ、Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）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２価の基である。〕で表され、かつＬ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能

性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔２〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔４〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式（Ｖ２）：

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ２）

〔式中、

Ｆ、Ｂ、Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）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価の基である。〕で表され、かつＦ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、あるいは

下記式（Ｖ３）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ３）

〔式中、

Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）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２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、かつＦａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であるである、〔２〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔５〕の可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔１〕～〔４〕のいずれかの可溶タンパク質またはその塩。

〔６〕可溶性タンパク質がＩｇＧ抗体である、〔１〕～〔５〕のいずれかの

可溶性タンパク質またはその塩。

〔７〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔１〕～〔６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔８〕可溶性タンパク質が、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抗体である、〔１〕～〔７〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩：

（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。

〔９〕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、〔１〕～〔８〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１０〕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、〔９〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１１〕前記標的領域が、（ａ）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、（ｂ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における２８８～２９０位のアミノ酸残基からなる領域、または（ｃ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における３１７位のアミノ酸残基からなる領域である、〔１０〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１２〕前記位置選択性が５０％以上である、〔１〕～〔１１〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１３〕前記位置選択性が７０％以上である、〔１２〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１４〕前記位置選択性が９０％以上である、〔１３〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔１５〕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、〔１〕～〔１４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１６〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

多量体タンパク質に含まれる複数の単量体タンパク質中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において機能性物質を有する結果、前記多量体タンパク質が複数の機能性物質を有する、〔１〕、〔５〕～〔１５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１７〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において機能性物質を有する結果、抗体が複数の機能性物質を有する、〔１〕、〔５〕～〔１６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１８〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

Ｔが、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、Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を複数個有する、〔２〕～〔１５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔１９〕前記可溶性タンパク質が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

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、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２０〕重鎖の個数が２個である、〔１７〕または〔１９〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔２１〕Ｌ１が、下記式（Ｌ１－１）～（Ｌ１－２）：

Ｃ１－Ｌｂ　　（Ｌ１－１）

Ｃ１　　（Ｌ１－２）

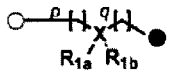
〔式中、

Ｌｂは、２価の基であり、

Ｃ１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。〕のいずれか一つで表される、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔２０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２２〕前記Ｌｂが、下記式（Ｌｂ’）：

[化21]



（Ｌｂ’）

〔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、Ｃ１に対する結合を示し、●（黒丸）はＢに対する結合を示す。〕で表される、〔２１〕の可溶性タンパク質またはその塩。

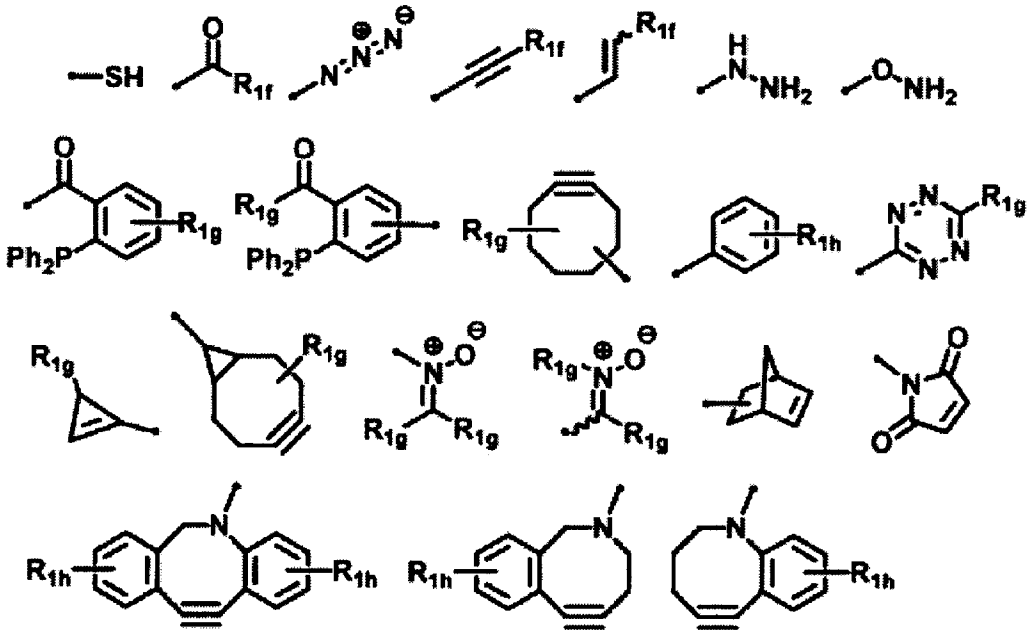
〔２３〕生体直交性官能基を含む２価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、α－ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より

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〕～〔２２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２４〕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、α－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〕～〔２２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２５〕生体直交性官能基が、下記：

[化22]



〔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、

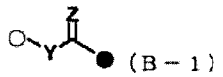
・は、結合手である。）で表されるいずれか一つである、〔１〕～〔２４

〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２６〕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$_a$－（Ｒ$_a$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〕～〔２５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２７〕Ｂが、下記式（Ｂ－１）：

[化23]

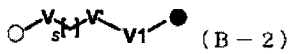


（Ｂ－１）

〔式中、

Ｙは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または下記式（Ｂ－２）：

[化24]



（Ｂ－２）

（式中、

ＶおよびＶ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または単結合であり、

Ｖ１は、生体直交性官能基を含む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$_2$－を示す。）であり、

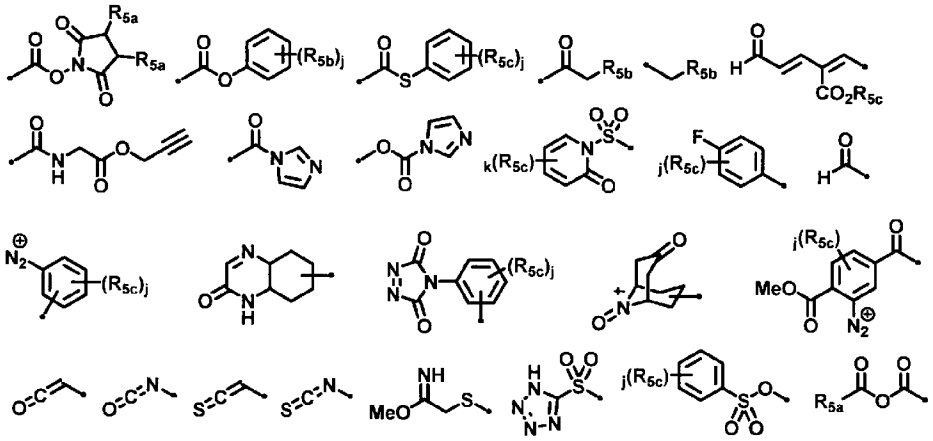
式（Ｂ－１）における○（白丸）は、Ｌ側の部分に対する結合を示し、●（黒丸）はＲ側の部分に対する結合を示す。〕で表される、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔２６〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２８〕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、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔２７〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔２９〕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〕～〔１５〕、〔１８〕～〔２８〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３０〕反応性基が、下記：

[化25]



〔ここで、

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

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。〕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、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔２９〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３１〕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が２～１０個であるリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔３０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３２〕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が環構造を含まないリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔３１〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

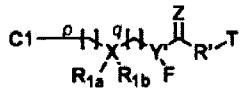
〔３３〕Ｌ１末端部分およびＲ’を連結する主鎖の原子数が２～１０個である、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔３２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３４〕ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔３３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３５〕Ｌ１－Ｂで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔３４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３６〕前記式（Ｖ１）、（Ｖ２）および（Ｖ３）で表される、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩が、それぞれ、下記（Ｖ１’）、（Ｖ２’）および（Ｖ３’）：

[化26]



（Ｖ１’）

〔式中、

Ｃ１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。

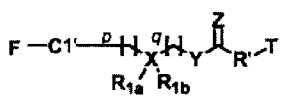
ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}およびR_{1b}は、前記式（Ｌｂ’）のものと同じであり、

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、

Ｚは、前記式（Ｂ－１）のものと同じであり、

Ｆ、Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）のものと同じである。〕、

[化27]



（Ｖ２’）

〔式中、

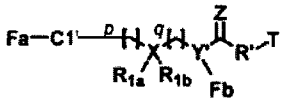
Ｃ１’は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。

ｐ、ｑ、Ｘ、Ｒ$_{1a}$およびＲ$_{1b}$は、前記式（Ｌｂ’）のものと同じであり、

ＹおよびＺは、前記式（Ｂ－１）のものと同じであり、

Ｆ、Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）のものと同じである。〕、あるいは

[化28]



（Ｖ３’）

〔式中、

Ｃ１’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。

ｐ、ｑ、Ｘ、Ｒ$_{1a}$およびＲ$_{1b}$は、前記式（Ｌｂ’）のものと同じであり、

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、

Ｚは、前記式（Ｂ－１）のものと同じであり、

ＦａおよびＦｂは、同一または異なる機能性物質であり、

Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）のものと同じである。〕で表される、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔２〕～〔１５〕、〔１８〕～〔３５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３７〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、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、かつ

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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

性で結合しており、

機能性物質がリジン残基の側鎖を介して可溶性タンパク質に結合しており、

可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において機能性物質を有する結果、抗体が複数の機能性物質を有する、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔３８〕下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、抗体のリジン残基と、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り、

Ｔは、抗体であり、

抗体は、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。〕で表され、かつＦ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔３９〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式（Ｖ１）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ１）

〔式中、

Ｌ１、Ｆ、Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）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２価の基である。〕で表され、かつＬ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔３８〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔４０〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式（Ｖ２）：

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ２）

〔式中、

Ｆ、Ｂ、Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）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価の基である。〕で表され、かつＦ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、あるいは

下記式（Ｖ３）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ３）

〔式中、

Ｒ’およびＴは、前記式（Ｖ）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２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、かつＦａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔３８〕の可溶性タンパク質またはその塩。

[0023] （機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法）

本発明はまた、上記〔１〕～〔４０〕の可溶性タンパク質のうち、式（Ｖ）またはその下位の式による特定を要する、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

〔４１〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、あるいは

下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、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個以上含む可溶性タンパク質である。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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’およびＴは、前記式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のものと同じである。〕で表され、かつＦ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[0024] 好ましくは、上記〔４１〕の方法は、以下であってもよい。

〔４２〕前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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、かつＬ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔４１〕の方法。

〔４３〕前記生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、１種または２種の機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ２）：

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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。〕で表され、かつＦ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質、または

下記式（Ｖ３）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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、かつＦａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔４１〕の方法。

〔４４〕可溶性タンパク質が抗体であり、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、〔４１〕～〔４３〕のいずれかの方法。

〔４５〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

（Ａ）下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａ、Ｌ、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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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、かつＬ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔４６〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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位置選択的に有する化合物またはその塩を、可溶性タンパク質（ここで、可溶性タンパク質は、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。）と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

（Ｂ）前記可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｃ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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、かつＬ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔４７〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

（Ａ）下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質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位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、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）

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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。〕で表され、かつＦ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、または

下記式（Ｖ３）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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、かつＦａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔４８〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒは、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質（ここで、可溶性タンパク質は、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。）と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可

溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

（Ｂ）前記可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質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位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、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）：

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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。〕で表され、かつＦ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、または

下記式（Ｖ３）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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、かつＦａ－Ｌ１’－B’（－Ｆｂ）－R’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

発明の効果

[0025] （Ｉ）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本発明の化合物またはその塩は、例えば、可溶性タンパク質の位置選択的な修飾に有用である。

（ＩＩ）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩、（ＩＩＩ）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を（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（ＩＶ）生体直交性官能基を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、例えば、機能性物質を（位置選択的に）有する可溶性タンパク質またはその塩の調製のための中間体として有用である。

（Ｖ）機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、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。特に、可溶性タンパク質が抗体である場合、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、これらの用途に適している。

図面の簡単な説明

[0026] [図1-1]図１－１は、本発明の化合物〔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：Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ（Ｉ）〕による可溶性タンパク質（例、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、可溶性タンパク質に対する親和性物質（Ａ）を介して、抗体等の可溶性タンパク質（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、親和性物質と可溶性タンパク質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、本発明の化合物と可溶性タンパク質とのコンジュゲート〔可溶性タンパク質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可溶性タンパク質：Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ（ＩＩ）〕を生成する。

[図1-2]図１－２は、本発明の化合物による可溶性タンパク質（例、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可溶性タンパク質（例、抗体）が生成する。

[図1-3]図１－３は、本発明の化合物による可溶性タンパク質（例、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可溶性タンパク質（例、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、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を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質を生成する。反応（２）では、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体を生成する。反応（３）では、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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可溶性タンパク質を

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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質を生成する（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可溶性タンパク質を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する可溶性タンパク質を生成する。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。

[図3]図３は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）で特異的に修飾された抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブのＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析（検出：２２５ｎｍ）を示す図である。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＋ペプチド試薬　１２等量（反応後Ａｍｉｃｏｎ１０Ｋにより溶媒置換）；ｂ：トラスツズマブ＋ペプチド試薬１２等量；ｃ：トラスツズマブ＋ペプチド試薬６等量；ｄ：トラスツズマブ原料；ｅ：ペプチド試薬のみ；ｆ：ＤＭＦのみ。

[図4]図４は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）で特異的に修飾された抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブのＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析（検出：２８０ｎｍ）を示す図である。サンプルについては、図１と同様の条件で反応させた。

[図5]図５は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）で特異的に修飾された抗ＣＤ２０抗体リツキシマブのＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析（検出：２２５ｎｍ）を示す図である。サンプルについては以下の条件で反応させた。ａ：リツキシマブ＋ペプチド試薬　１２等量（反応後Ａｍｉｃｏｎ１０Ｋにより溶媒置換）；ｂ：リツキシマブ＋ペプチド試薬１２等量；ｃ：リツキシマブ＋ペプチド試薬６等量；ｄ：リツキシマブ原料；ｅ：ペプチド試薬のみ；ｆ：ＤＭＦのみ。

[図6]図６は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）で特異的に修飾された抗ＣＤ２０抗体リツキシマブのＨＩＣ－Ｈ

ＰＬＣ解析（検出：２８０ｎｍ）を示す図である。サンプルについては以下の条件で反応させた。ａ：リツキシマブ＋ペプチド試薬　１２等量（反応後Ａｍｉｃｏｎ１０Ｋにより溶媒置換）；ｂ：リツキシマブ＋ペプチド試薬１２等量；ｃ：リツキシマブ＋ペプチド試薬６等量；ｄ：リツキシマブ原料；ｅ：ペプチド試薬のみ；ｆ：ＤＭＦのみ。

[図7]図７は、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により得られる生成物のＲＰ－ＨＰＬＣによる解析（検出：２２５ｎｍ、および２８０ｎｍ）を示す図である。ａ：トラスツズマブ；ｂ：トラスツズマブ＋ペプチド試薬６等量；ｃ：トラスツズマブをＤＴＴにより還元；ｄ：ｂｕｆｆｅｒ　ｐＨ８．０，抗体濃度７２μＭでＤ，Ｌ－ジチオトレイトールにより還元；ｅ：ｄをデヒドロアスコルビン酸により再酸化３時間後；ｆ：ｄをデヒドロアスコルビン酸により再酸化２４時間後。

[図8]図８は、（１）糖鎖をＰＮＧａｓｅで切断したトラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列、（２）糖鎖をＰＮＧａｓｅで切断したＩｇＧ１　Ｆｃ領域のアミノ酸配列、および（３）トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

[図9]図９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（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ（配列番号５）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　９９８．１４７９６、３価）を示す図である。

[図10]図１０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（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ（配列番号５）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[図11]図１１は、トラスツズマブのＧｌｕ－Ｃ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール

導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤ（配列番号６）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　９２９．４９６５１、２価）を示す図である。

[図12]図１２は、トラスツズマブのＧｌｕ－Ｃ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤ（配列番号６）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[図13]図１３は、ＩｇＧ１　Ｆｃのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＥＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ（配列番号７）のペプチドフラグメントの（ｍ／ｚ　９９４．１２５４６、３価）のＭＳスペクトルを示す図である。

[図14]図１４は、ＩｇＧ１　Ｆｃのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＥＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ（配列番号７）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[図15]図１５は、ＩｇＧ１　ＦｃのＧｌｕ－Ｃ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥ（配列番号８）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　８９２．１２６２４、３価）を示す図である。

[図16]図１６は、ＩｇＧ１　ＦｃのＧｌｕ－Ｃ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を含む、ＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥ（配列番号８）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[図17]図１７は、トラスツズマブの重鎖中のＦｃ領域、およびＩｇＧ１　Ｆｃ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。

[図18]図１８は、修飾されたトラスツズマブ（ＩｇＧ１）について同定されたアミノ酸配列および修飾を示す図である。グレー部分が同定されたアミノ酸配列である。また、アミノ酸配列の上部に同定された修飾が記されている。囲われた二箇所のリジン残基（ＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇによる　２４６位・２４８位）のみ位置選択的なアジド導入体の修飾が確認された。

[図19]図１９は、トラスツズマブのアジド導入体の修飾部位を示す図である。ＰＳＭｓ（Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｍａｔｃｈｅｓ）とは、該当するペプチドと一致するスペクトルが観測された回数のことであり、多いほど確からしさが上がる。シグナル強度に関するフィルターをかけることで（２）のように２４６位のリジン残基のみに修飾が同定されるようになった。（１）でのみ同定されている修飾部位はノイズの可能性が高いと考えられる。

[図20]図２０は、トラスツズマブのアジド導入体の修飾部位を含むペプチドのＣＩＤスペクトルを示す図である。図１８において囲われた部分のペプチドのＣＩＤスペクトルに対応する。理論値と一致するｍ／ｚを持つスペクトルが示されている。

[図21]図２１は、ＣＩＤスペクトルが同定されたｂ／ｙイオンを示す図である。図２０において同定されたｂ／ｙイオンが示されている。ｂ２５イオンが同定されていることから、ＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇによる２４６位が修飾されている可能性が高いことが分かる。

[図22]図２２は、修飾トラスツズマブの非修飾トラスツズマブとの面積値比較を示す図である。修飾が起こった部位に関しては非修飾ペプチドの面積値が小さくなるとの予測に基づき、非修飾トラスツズマブで得られた面積値と比較したところ、ＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇによる２４６位・２４８位のリジン残基を含むペプチドでのみ有意に面積値が減少していた。

[図23]図２３は、Ｑ－ＴＯＦＭＳによる修飾トラスツズマブのＤＡＲの解析

を示す図である。ピークの観測結果より、平均ＤＡＲは２であった。

[図24]図２４は、検索に用いたアミノ酸配列データを示す図である。脱糖鎖を行うことでトラスツズマブの重鎖の３００残基目のＮがＤに変わることが知られているため、重鎖のアミノ酸配列については二種類を解析に使用した。

[図25]図２５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（アジド導入体（＋２５４．１０２Ｄａ））を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　９７９．４９９８２、理論値：９７９．４９９７５、４価）を示す図である。

[図26]図２６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（アジド導入体（＋２５４．１０２Ｄａ））を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例１６）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例１７）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例１８）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例１９）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実

施例２０）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２１）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２２）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２３）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２４）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２５）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２６）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２７）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２８）。

[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：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２９）。

[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（検出波長：ＵＶ２２５ｎｍまたはＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３０）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３１）。縦軸のＡＵは、吸光度を示す（以降の図面において同様）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３２）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３３）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３４）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３５）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３６）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３７）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３８）。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例３９）。

[図51]図５１は、実施例３９のバインダーペプチドを用いて修飾した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、ＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ（配列番号６６）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　７９１．７４８７２、３価）を示す図である。

[図52]図５２は、実施例３９のバインダーペプチドを用いて修飾した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、ＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ（配列番号６６）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[図53]図５３は、実施例３９のバインダーペプチドを用いて修飾した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、ＥＥＱＹＤＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ（配列番号６７）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　８８６．９３４０８、４価）を示す図である。

[図54]図５４は、実施例３９のバインダーペプチドを用いて修飾した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、ＥＥＱＹＤＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ（配列番号６７）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例４０）。

[図56]図５６は、実施例４０のバインダーペプチドを用いて修飾した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、ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲ（配列番号６９）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　７６９．０４６８８、３価）を示す図である。

[図57]図５７は、実施例４０のバインダーペプチドを用いて修飾した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、ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲ（配列番号６９）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例４１）。

[図59]図５９は、チオール導入体を用いて修飾した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、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　９５２．２３１４５、４価）を示す図である。

[図60]図６０は、チオール導入体を用いて修飾した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、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例４２）。

[図62]図６２は、チオール導入体を用いて修飾した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、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　９５２．２２９６８、４価）を示す図である。

[図63]図６３は、チオール導入体を用いて修飾した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Ｃａｒ

ｂａｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４５．０１９Ｄａ））を含む、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[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：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例４３）。

[図65]図６５は、チオール導入体を用いて修飾した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、ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲ（配列番号６９）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（ｍ／ｚ　７６９．０４５２９、３価）を示す図である。

[図66]図６６は、チオール導入体を用いて修飾した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、ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲ（配列番号６９）のペプチドフラグメントのＣＩＤスペクトルを示す図である。

[図67]図６７は、ヒトＩｇＧ２抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析の結果（検出波長：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２－２）。

[図68]図６８は、ヒトＩｇＧ２抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析の結果（検出波長：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例４３）。

[図69]図６９は、ヒトＩｇＧ４抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析の結果（検出波長：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例２－２）。

[図70]図７０は、ヒトＩｇＧ４抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析の結果（検出波長：ＵＶ２８０ｎｍ）を示す図である（実施例４３）。

発明を実施するための形態

[0027] 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、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、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕

[0028] 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。

[0029] １－２．可溶性タンパク質に対する親和性物質（Ａ）

式（Ｉ）において、Ａは、可溶性タンパク質に対する親和性物質である。親和性物質とは、標的に対して非共有結合による結合能を有する物質である。

[0030] 本発明で用いられる親和性物質は、分泌タンパク質とも呼称される可溶性タンパク質を標的とする。このような可溶性タンパク質としては、例えば、抗体、可溶性受容体、リガンド、アルブミン、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、血管内皮細胞増殖因子（Ａｎｔｉ－ＶＥＧＦ）、骨形成タンパク質、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、グルカゴン、顆粒状コロニー刺激因子、顆粒状マクロファージコロニー刺激因子、繊毛性ゴナドトロビン、インスリン、インターロイキン、インターフェロン、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、増殖因子（ＴＧＦファミリー、ＦＧＦファミリー）が挙げられる。可溶性タンパク質は、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。

[0031] 親和性物質の標的である可溶性タンパク質はまた、天然由来タンパク質、または人工タンパク質である。

[0032] 天然由来タンパク質としては、例えば、生物およびウイルス由来のタンパク質が挙げられる。生物由来のタンパク質としては、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、および魚類由来のタンパク質が挙げられる。好ましくは、天然由来タンパク質は、哺乳動物由来のタンパク質である。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。天然由来タンパク質は、より好ましくは、霊長類または齧歯類由来のタンパク質であり、さらにより好ましくは、本発明の臨床応用の観点から、ヒト由来のタンパク質である。ウイルス由来のタンパク質としては、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、ファージウイルスが挙げられる。

[0033] 人工タンパク質としては、例えば、天然由来タンパク質の改変タンパク質（例、置換、欠失および挿入からなる群より選ばれる１以上のアミノ酸残基の変異が天然由来タンパク質に導入されたタンパク質）、融合タンパク質、および人工的に設計されたモノクローナル抗体が挙げられる。人工的に設計された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、ｓｃＦｖ抗体、Ｆａｂ抗体、Ｆ（ａｂ‘）$_2$抗体、ＶＨＨ抗体、Ｆｃ領域タンパク質、Ｆｃ融合タンパク質が挙げられる。

[0034] 親和性物質の標的である可溶性タンパク質はさらに、単量体タンパク質、または多量体（例、二量体、三量体、または四量体）タンパク質であってもよい。親和性物質の標的であるタンパク質が多量体タンパク質である場合、

多量体タンパク質は、ホモ多量体、またはヘテロ多量体である。多量体タンパク質は、共有結合（例、ジスルフィド結合）を介して多量体を形成するタンパク質（例、ジスルフィド結合を介して、軽鎖および重鎖からなる単位が２つ連結している構造を有する抗体）であっても、非共有結合（すなわち、会合）を介して多量体を形成するタンパク質であってもよいが、共有結合を介して多量体を形成するタンパク質が好ましい。親和性物質の標的である多量体タンパク質としては、例えば、２価の抗体（例、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＥ）、４価以上の抗体（例、ＩｇＡ抗体、ＩｇＭ抗体）、アルブミンが挙げられる。

[0035] 親和性物質の標的である可溶性タンパク質はまた、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－α－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）。可溶性タンパク質は、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。可溶性タンパク質はまた、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、可溶性タンパク質は、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。可溶性タンパク質が抗体（例、上述したような人工的に設計された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。

[0036] 親和性物質の標的である可溶性タンパク質はさらに、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。本発明の化合物が可溶性タンパク質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可溶性タンパク質が好ましい。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可溶性タンパク質であっても、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ＩｇＧ１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ＩｇＧ１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。

[0037] より具体的には、本発明では、抗体等のタンパク質の機能を維持しつつ（

すなわち、タンパク質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）、タンパク質中の特定の位置に存在するアミノ酸残基を修飾する観点から、タンパク質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＿ＩＧＨＧｎｂｅｒ．ｈｔｍｌを参照）。

（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）

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。

[0038] 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。

（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。

[0039] 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。

[0040] 特定の実施形態では、親和性物質の標的である可溶性タンパク質は、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：

（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（以下、本明細書では単に「Ｌｙｓ２４６」とも表記し、ヒトＩｇＧ　ＣＨ２領域（配列番号１）の１６番目の残基に相当する）

：

（２）Ｌｙｓ２８８残基（以下、本明細書では単に「Ｌｙｓ２８８」とも表記し、ヒトＩｇＧ　ＣＨ２領域（配列番号１）の５８番目の残基に相当する

）またはＬｙｓ２９０残基（以下、本明細書では単に「Ｌｙｓ２９０」とも表記し、ヒトＩｇＧ　ＣＨ２領域（配列番号１）の６０番目の残基に相当する）；

（３）Ｌｙｓ３１７残基（以下、本明細書では単に「Ｌｙｓ３１７」とも表記し、ヒトＩｇＧ　ＣＨ２領域（配列番号１）の８７番目の残基に相当する）。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 好ましい実施形態では、可溶性タンパク質に対する親和性物質は、抗体に対する親和性物質である。抗体は、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体である。抗体のアイソタイプとしては、例えば、ＩｇＧ（例、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、およびＩｇＹが挙げられる。抗体は、全長抗体、または抗体断片（例、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、単鎖抗体）であるが、全長抗体が好ましい。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] （１）がん領域

ＰＤ－Ｌ１、ＧＤ２、ＰＤＧＦＲα（血小板由来成長因子受容体）、ＣＤ２２、ＨＥＲ２、ホスファチジルセリン（ＰＳ）、ＥｐＣＡＭ、フィブロネクチン、ＰＤ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＣＤ３３、ＨＧＦ、ｇｐＮＭＢ、ＣＤ２７、ＤＥＣ－２０５、葉酸受容体、ＣＤ３７、ＣＤ１９、Ｔｒｏｐ２、ＣＥＡＣＡＭ５、Ｓ１Ｐ、ＨＥＲ３、ＩＧＦ－１Ｒ、ＤＬＬ４、ＴＮＴ－１／Ｂ、ＣＰＡＡｓ、ＰＳＭＡ、ＣＤ２０、ＣＤ１０５（エンドグリン）、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ３０、ＣＤ１６Ａ、ＣＤ３８、ＭＵＣ１、ＥＧＦＲ、ＫＩＲ２ＤＬ１，２，、ＮＫＧ２Ａ、ｔｅｎａｓｃｉｎ－Ｃ、ＩＧＦ（Ｉｎｓｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）、ＣＴＬＡ－４、ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ、ＣＤ１３８、ｃ－Ｍｅｔ、Ａｎｇ２、ＶＥＧＦ－Ａ、ＣＤ７９ｂ、ＥＮＰＤ３、葉酸受容体α、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、ＲＳＰＯ、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、α２－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、ＴＧＦβ、ＩＬ－１７、５Ｔ４、ＲＴＫ、Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ、ＮａＰｉ２ｂ、ルイス血液型Ｂ抗原、Ａ３４、Ｌｙｓｉｌ－Ｏｘｉｄａｓｅ、ＤＬＫ－１、ＴＲＯＰ－２、α９インテグリン、ＴＡＧ－７２（ＣＡ７２－４）、ＣＤ７０

[0048] （２）自己免疫疾患・炎症性疾患

ＩＬ－１７、ＩＬ－６Ｒ、ＩＬ－１７Ｒ、ＩＮＦ－α、ＩＬ－５Ｒ、ＩＬ－１３、ＩＬ－２３、ＩＬ－６、ＡｃｔＲＩＩＢ、β７－Ｉｎｔｅｇｒｉｎ、ＩＬ－４αＲ、ＨＡＳ、Ｅｏｔａｘｉｎ－１、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１５、ＣＤ３ε、Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ、ＩＬ－１β、ＩＬ－１α、ＩＬ－１７、ＴＳＬＰ（Ｔｈｙｍｉｃ Ｓｔｒｏｍａｌ Ｌｙｍｐｈｏｐｏｉｅｔｉｎ）、ＬＡＭＰ（Ａｌｐｈａ４ Ｂｅｔａ ７ 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－α、ＩＬ－７Ｒ、Ｋｖ１．３、α９インテグリン、ＬＩＦＨＴ

[0049] （３）脳神経疾患

ＣＧＲＰ、ＣＤ２０、βアミロイド、βアミロイドプロトフィブリン、Ｃａｌｃｉｔｏｎｉｎ Ｇｅｎｅ－Ｒｅｌａｔｅｄ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ、ＬＩＮＧＯ（Ｉｇ Ｄｏｍａｉｎ Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ１）、α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

[0050] （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

[0051] （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

[0052] （６）眼疾患

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

[0053] （７）骨・整形外科領域

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

[0054] （８）血液疾患

ｖＷＦ、Ｆａｃｔｏｒ ＩＸａ、Ｆａｃｔｏｒ Ｘ、ＩＦＮγ、Ｃ５、ＢＭＰ－６、Ｆｅｒｒｏｐｏｒｔｉｎ、ＴＦＰＩ

[0055] （９）その他の疾患

ＢＡＦＦ（Ｂ ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ）、ＩＬ－１β、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－１β、ＡＴ２－Ｒ、ＩＡＰＰ

[0056] より好ましい実施形態では、可溶性タンパク質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。

[0057] さらにより好ましい実施形態では、可溶性タンパク質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。

[0058] 特に好ましい実施形態では、可溶性タンパク質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。

[0059] 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。

[0060] 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または配列番号４１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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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；Ｃｏｍｐ

ｏｓｉｔｉｏｎａｌ 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。

[0065] 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、可溶性タンパク質として機能することを意味する。

[0066] 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。

[0067] 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）、β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。

[0068] 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、ダクリヅマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレンツズマブ、オマリヅマブ、エファリヅマブ、ベバシヅマブ、ナタリヅマブ（ＩｇＧ４）、トシリヅマブ、エクリヅマブ（ＩｇＧ２）、モガムリヅマブ、ペルツヅマブ、オビヌツヅマブ、ベドリヅマブ、ペンプロリヅマブ（ＩｇＧ４）、メポリヅマブ、エロツヅマブ、ダラツムマブ、イケセキヅマブ（ＩｇＧ４）、レスリヅマブ（ＩｇＧ４）、アテゾリヅマブ）、ヒト抗体（例、アダリムマブ、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（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、ブロダルマブ（ＩｇＧ２）、オララツマブ）が挙げられる（ＩｇＧサブタイプに言及していない場合、ＩｇＧ１であることを示す）。

[0069] 上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質としては、例えば、ペプチド（オリゴペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質を含む）、低分子化合物、核酸、核酸-ペプチド複合体、ペプチド－低分子化合物複合体、核酸一低分子複合体挙げられる。

[0070] 特定の実施形態では、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、ペプチド（オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質を含む。糖タンパク質であってもよい）であってもよい。このようなペプチドとしては、例えば、以下が報告されている：

（１）ヒトＩｇＧ全般（すなわち、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４。以下同様）の特定領域（ＣＨ２領域）に親和性を有するＩｇＧ結合ペプチド（例、国際公開第２０１６／１８６２０６号、国際公開２０１３／０２７７９６号、国際公開第２００８／０５４０３０号を参照）；

（２）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（ＣＨ２領域）に親和性を有するＰｒｏｔｅｉｎＡ Ｍｉｍｅｔｉｃ（ＰＡＭ） ｐｅｐｔｉｄｅ（例、Ｆａｓｓｉｎａ Ｇ ｅｔ ａｌ．，ＪＯＵＲＮＡＬ ＯＦ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＲＥＣＯＧＮＩＴＩＯＮ，１９９６，ＶＯＬ．６，５６４－５６９を参照）；

（３）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（ＣＨ２領域）に親和性を有するＥＰＩＨＲＳＴＬＴＡＬＬ（配列番号９）（例、Ｅｈｒｌｉｃｈ Ｇ．Ｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２００１，ＶＯＬ．４９，４４３－４５４を参照）；

（４）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（Ｆｃ領域）に親和性を有する（ＮＨ２－Ｃｙｓ１－Ｘ１－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ４）２－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－ＯＨ（例、Ｒｕｖｏ Ｍ ｅｔ ａｌ．，ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ，２００５，ＶＯＬ．６，１２４２－１２５３を参照）；

（５）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（Ｆｃ領域）に親和性を有するＦＡＲＬＶ

ＳＳＩＲＹ（配列番号１０）、ＦＧＲＬＶＳＳＩＲＹ（配列番号１１）、およびＴＷＫＴＳＲＩＳＩＦ（配列番号１２）（例、Ｋｒｏｏｋ Ｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，１９９８，ＶＯＬ．２２１，１５１－１５７を参照）；

（６）ヒトＩｇＧ全般の特定領域に親和性を有するＱＳＹＰ（配列番号１３）（例、Ｊａｃｏｂｓ Ｊ．Ｍ． ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ．Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，２００３，ＶＯＬ．３４，１３２－１４１を参照）；

（７）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（Ｆｃ領域）に親和性を有するＨＷＲＧＷＶ（配列番号１４）、ＨＹＦＫＦＤ（配列番号１５）、およびＨＦＲＲＨＬ（配列番号１６）（例、Ｃａｒｂｏｎｅｌｌ Ｒ．Ｇ． ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ａ，２００９，ＶＯＬ．１２１６，９１０－９１８を参照）；

（８）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（Ｆｃ領域）に親和性を有するＤＡＡＧ（配列番号１７）（例、Ｌｕｎｄ Ｌ．Ｎ． ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ａ，２０１２，ＶＯＬ．１２２５，１５８－１６７を参照）；

（９）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（Ｆｃ領域）に親和性を有するＦｃ－Ｉ、Ｆｃ－ＩＩ、およびＦｃ－ＩＩＩ（例、Ｗａｒｒｅｎ Ｌ．Ｄｅｌａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０００，ＶＯＬ．２８７，１２７９－１２８３；国際公開２００１／０４５７４６号を参照）；ならびに

（１０）ヒトＩｇＧ全般の特定領域（Ｆｃ領域）に親和性を有するＮＡＲＫＦＹＫＧ（配列番号１８）、およびＮＫＦＲＧＫＹＫ（配列番号１９）（例、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｊｏｕｒｎａｌ，２０１３，ＶＯＬ．７９，３３－４０を参照）。

[0071] 別の特定の実施形態では、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、ペプチド以外の物質であってもよい。このような物質としては、例えば、ヒトＩｇＧ（例、ヒトＩｇＧ１～４）の特定領域（ＣＨ２領域、特にＬｙｓ３４０の側鎖）に親和性を有するアプタマー〔例、ＧＧＵＧＣＵお

よびＧＧＵＧＡＵ等のＧＧＵＧ（Ｃ／Ａ）（Ｕ／Ｔ）モチーフ含有アプタマー〕が報告されている（例、国際公開第２００７／００４７４８号公報；Ｎｏｍｕｒａ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２０１０　Ｎｏｖ；３８（２１）：７８２２－９；Ｍｉｙａｋａｗａ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ．，２００８　Ｊｕｎ；１４（６）：１１５４－６３を参照）。

[0072] 上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、当該分野における任意の公知の方法により得ることができる。例えば、可溶性タンパク質全体、または可溶性タンパク質中の部分ペプチド（例、タンパク質表面露出領域が判明している場合、当該領域中に存在する部分ペプチド）を用いて、抗体を作製することにより（例、ハイブリドーマ法）、または親和性物質を入手可能なライブラリ（例、ペプチドライブラリ、抗体ライブラリ、抗体産生細胞ライブラリ、アプタマーライブラリ、ファージライブラリ、ｍＲＮＡライブラリ、ｃＤＮＡライブラリ）から親和性物質をスクリーニングすることにより（例、ファージディスプレイ法、ＳＥＬＥＸ法、ｍＲＮＡディスプレイ法、リボソームディスプレイ法、ｃＤＮＡディスプレイ法、酵母ディスプレイ法）、取得することができる。また、可溶性タンパク質に対する親和性物質が抗体のＦｃ領域（可溶性領域）に対する親和性物質である場合、各種抗体（例、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ）のＦｃ領域の特定領域（例、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３）中に存在する部分ペプチドを用いることにより、抗体のＦｃ領域中の任意の部分に対して選択的に結合することができる親和性物質（例、抗体、アプタマー）を効率的に取得することができる。このようにして取得される親和性物質のなかには、親和的結合能が相対的に強いものおよび弱いものが混在する。しかし、親和的結合能が弱い親和性物質であっても、過剰量で用いることにより、その親和的結合能を補強することができる。

[0073] 上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、下記式（ｉ）で表されるＩｇＧ結合性ペプチドまたはその塩であってもよい（例、実施例お

よび国際公開第２０１６／１８６２０６号）。

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９４）　（ｉ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕

によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩。

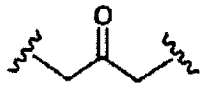
Ｘａａ１およびＸａａ２はそれぞれ異なるアミノ酸残基であることが好ましい。

[0074] 本明細書において、Ｎ末端またはＣ末端のX_{1-3}という表記は、システイン（ＣまたはＣｙｓ）以外の独立的に任意のアミノ酸残基Ｘが１～３個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じか、または異なる残基であるが、好ましくは３個すべてが同じ残基でない配列からなる。同様に、Ｘ２もシステイン（ＣまたはＣｙｓ）以外の独立的に任意のアミノ酸残基Ｘが２個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じ

か、または異なる残基であるが、好ましくは当該２個連続しているアミノ酸残基は同じ残基でない配列からなる。後述するＸ１もシステイン（ＣまたはＣｙｓ）以外の独立的に任意のアミノ酸残基Ｘが１個存在することを意味する。

[0075] また、本明細書において、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。通常、上記式（ｉ）等の式のペプチドにおいて、外側の２つのシステイン残基は、ジスルフィド結合している。あるいは、上記式（ｉ）等の式のペプチドにおいて、外側の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。

[0076] [化29]



[0077] 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、通常の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。

[0078] 特定の実施形態では、上記式（ｉ）の親和性物質は、下記式（ｉ－１）で表されるＩｇＧ結合性ペプチドまたはその塩であってもよい（例、国際公開第２０１６／１８６２０６号）。

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９５）　（ｉ－１）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇはグリシン残基であり、

Ｘａａ２はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Ｌはロイシン残基であり、

Ｖはバリン残基であり、かつ

Ｗはトリプトファン残基である。〕

によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩。

Ｘａａ１およびＸａａ２はそれぞれ異なるアミノ酸残基であることが好ましい。

[0079] 別の特定の実施形態では、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、下記式（ｉ－２）で表されるＩｇＧ結合性ペプチドまたはその塩であってもよい（例、実施例）。

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９６）　（ｉ－２）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、グルタミン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩。

このような特定の構造を有する国際公開第２０１６／１８６２０６号に未開示の親和性物質は、ヒトＩｇＧ　ＦｃにおけるＥｕ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇに従うＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６残基、あるいはＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６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）。

[0080] 式（ｉ－１）のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Ｘをさらに特定した式（ｉ－１’）および式（ｉ－１’’）で表されるペプチドを以下に示す。

[0081] すなわち、式（ｉ－１’）で表されるペプチドは、

（X_{1-3}）－Ｃ－（Ｘ１）－Ｙ－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－Ｎ－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９７）　（ｉ－１’）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｙは、チロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｎは、アスパラギン残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕

で表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇ　Ｇおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とする。

[0082] 式（ｉ－１’’）で表されるペプチドは、

（X_{1-3}）－Ｃ－Ａ－（Ｘ１）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－Ｅ－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９８）　（ｉ－１’’）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ａは、アラニン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｅは、グルタミン酸残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕

で表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とする。

[0083] また、式（ｉ－１）のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Ｘをさらに特定した式（ｉｉ）で表されるペプチドを以下に示す。

[0084] すなわち、式（ｉｉ）で表されるペプチドは、

（X_{1-3}）－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘ

ａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（$Ｘ_{1-3}$）　（配列番号９９）　（ｉｉ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、グルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、セリン残基またはスレオニン残基であり、かつ

Ｘａａ４は、チロシン残基またはトリプトファン残基である。〕

で表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とする。

[0085] 式（ｉ）等の式のペプチドのアミノ酸配列において、１７アミノ酸残基とした場合、Ｎ末端から１番目および２番目、ならびに１６番目および１７番目のアミノ酸残基Ｘは欠失していてもよく、そのようなペプチドは１３アミノ酸長からなる。

[0086] 本明細書で使用する「１７アミノ酸残基とした場合」とは、ペプチドのアミノ酸残基をアミノ酸番号で呼ぶときに、式（ｉ）のペプチド等について最長のアミノ酸長である１７残基のＮ末端から順番に１番目から１７番目まで番号づけするために便宜的に表現した用語である。

[0087] また、式（ｉ－１）のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Ｘを

さらに特定した式（ｉｉｉ）で表されるペプチドを以下に示す。

[0088] すなわち、式（ｉｉｉ）で表されるペプチドは、

（X_{1-3}）－Ｃ－Ａ－Ｙ－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－Ｅ－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}） （配列番号１００） （ｉｉｉ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ａは、アラニン残基であり、

Ｙは、チロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｅは、グルタミン酸残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕

で表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とする。

[0089] 式（ｉｉｉ）のペプチドのアミノ酸配列において、１７アミノ酸残基とした場合、Ｎ末端から１番目および２番目、ならびに１６番目および１７番目のアミノ酸残基Ｘは欠失していてもよく、そのようなペプチドは１３アミノ酸長からなる。

[0090] さらに、上記の各式のペプチドのアミノ酸配列のシステイン（Ｃ）以外のアミノ酸残基、すなわち、１７アミノ酸残基とした場合、Ｎ末端から１～３、５、６、１５～１７番目の各アミノ酸残基は、以下のものから選択される

ことが好ましい。ここで、各大文字のアルファベットは、アミノ酸の一文字表記である：

１番目のアミノ酸残基＝Ｓ、Ｇ、Ｆまたは、なし

２番目のアミノ酸残基＝Ｄ、Ｇ、Ａ、Ｓ、Ｐ、ホモシステインまたは、なし

３番目のアミノ酸残基＝Ｓ、Ｄ、Ｔ、Ｎ、ＥまたはＲ、

１５番目のアミノ酸残基＝Ｓ、ＴまたはＤ、

１６番目のアミノ酸残基＝Ｈ、Ｇ、Ｙ、Ｔ、Ｎ、Ｄ、Ｆ、ホモシステインまたは、なし、

１７番目のアミノ酸残基＝Ｙ、Ｆ、Ｈ、Ｍまたは、なし。

５番目のアミノ酸残基＝ＡまたはＴ、

６番目のアミノ酸残基＝ＹまたはＷ。

[0091] また、式（ｉ－１）のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Ｘをさらに特定した式（ｉｖ）で表されるペプチドを以下に示す。

[0092] すなわち、式（ｉｖ）で表されるペプチドは、

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－Ｔ　（配列番号１０１）　　（ｉｖ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、グルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Wは、トリプトファン残基であり、

Ｔは、スレオニン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基またはスレオニン残基であり、かつ、

Ｘａａ４は、チロシン残基またはトリプトファン残基である。〕で表される、１３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とする。

[0093] 式（ｉ－１）のペプチドの具体例のいくつかを以下の（１）～（１９）に列挙するが、これらに制限されないことはいうまでもない：

（１）ＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号２０）；

（２）ＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２１）；

（３）ＲＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＳ（配列番号２２）；

（４）ＧＰＲＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＳＦＨ（配列番号２３）；

（５）ＳＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２４）；

（６）ＧＤＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２５）；

（７）ＧＰＳＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２６）；

（８）ＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＳＦＨ（配列番号２７）；

（９）ＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＨＨ（配列番号２８）；

（１０）ＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＹ（配列番号２９）；

（１１）ＳＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＹ（配列番号３０）；

（１２）ＳＤＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＹ（配列番号３１）；

（１３）ＲＧＮＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号３２）；

（１４）Ｇ（Ｘａａ２）ＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（Ｘａａ２）Ｈ（配列番号３３）；

（１５）ＲＲＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号３

４）；

（１６）ＤＣＴＹＨ（Ｘａａ１）ＧＮＬＶＷＣＴ（配列番号３５）；

（１７）ＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＮＬＶＷＣＴ（配列番号３６）；

（１８）ＤＣＴＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号３７）；および

（１９）ＤＣＡＷＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号３８）。

〔式中、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｘａａ２は、ホモシステインであり、

好ましくは、ホモシステイン同士は、互いにジスルフィド結合を形成している。〕。

[0094] 式（ｉ－１）のペプチドの好ましい具体例としては、以下が挙げられる：

（１）ＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号２０）；

（２）ＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２１）；

（１３）ＲＧＮＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号２２）；

（１４）Ｇ（Ｘａａ２）ＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（Ｘａａ２）Ｈ（配列番号３３）；および

（１５）ＲＲＧＰＤＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号３４）。

〔式中、

Ｘａａ１は、リジン残基であり、

Ｘａａ２は、ホモシステインであり、

好ましくは、システイン同士および／またはホモシステイン同士は、互いにジスルフィド結合を形成している。〕

[0095] 上記（１３）のペプチドは、ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号３９）であってもよい。

[0096] 別の特定の実施形態では、上記式（ｉ）の親和性物質は、下記式（ｖ）で表されるＩｇＧ結合性ペプチドまたはその塩であってもよい（例、実施例）。

（X_{1-3}）－Ｃ－（Ｘａａ３）－（ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）（配列番号１０２）　（ｖ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩。

[0097] このような特定の構造を有する国際公開第２０１６／１８６２０６号に未

開示の親和性物質は、ヒトＩｇＧ　ＦｃにおけるＥｕ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇに従うＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６残基、あるいはＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６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）。好ましくは、Ｘａａ３、Ｘａａ１、Ｘａａ２、Ｘａａ５、Ｘａａ６、およびＸａａ７のいずれか一つが、リジン残基である。Ｘａａ１は、好ましくは、アルギニン残基、またはロイシン残基であってもよい。あるいは、Ｘａａ１は、好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、より好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基であってもよい。

[0098] 式（ｖ）のペプチドのアミノ酸配列において、１７アミノ酸残基とした場合、Ｎ末端から１番目および２番目、ならびに１６番目および１７番目のアミノ酸残基Ｘは欠失していてもよく、そのようなペプチドは１３アミノ酸長からなる。

[0099] さらに、上記式（ｖ）のペプチドのアミノ酸配列のシステイン（Ｃ）以外のアミノ酸残基、すなわち、１７アミノ酸残基とした場合、Ｎ末端から１～３番目の各アミノ酸残基は、以下のものから選択されることが好ましい。ここで、各大文字のアルファベットは、アミノ酸の一文字表記である：

１番目のアミノ酸残基＝Ｒ、Ｓ、Ｇ、Ｆまたは、なし（好ましくは、Ｒ、または、なし）

２番目のアミノ酸残基＝Ｄ、Ｇ、Ａ、Ｓ、Ｐ、ホモシステインまたは、なし（好ましくは、Ｇ、またはなし）

３番目のアミノ酸残基＝Ｓ、Ｄ、Ｔ、Ｎ、ＥまたはＲ（好ましくは、Ｎ、またはＤ）。

[0100] 式（ｖ）のペプチドの具体例のいくつかを以下の（１６）～（３４）に列挙するが、これらに制限されないことはいうまでもない：

（１６）ＲＧＮＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号７３）

（１７）ＲＧＮＣＡＷＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号７４）

（１８）ＲＧＮＣＡＷＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号７５）

（１９）ＲＧＮＣＫＷＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号７６）

（２０）ＲＧＮＣＫＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号７７）

（２１）ＲＧＮＣＫＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号７８）

（２２）ＤＣＫＷＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号７９）

（２３）ＤＣＫＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号８０）

（２４）ＤＣＫＷＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号８１）

（２５）ＤＣＫＷＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号８２）

（２６）ＤＣＫＹＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号８３）

（２７）ＤＣＫＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号８４）

（２８）ＤＣＫＷＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号８５）

（２９）ＤＣＫＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号８６）

（３０）ＲＧＮＣＡＷＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＫＹＨ（配列番号８７）

（３１）ＲＧＮＣＡＷＨ（Ｘａａ１）ＧＥＬＶＷＣＫＹＨ（配列番号８８）

（３２）ＲＧＮＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＫＨ（配列番号８９）

（３３）ＲＧＮＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＹＫ（配列番号９０）

（３４）ＲＧＮＣＡＹＨ（Ｘａａ１）ＧＱＬＶＷＣＴＫＨ（配列番号９１）

。

〔式中、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基である。〕。

好ましくは、Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基であり、より好ましくはリジン残基である。

[0101] また、ＩｇＧ結合性ペプチドは、広義の一次構造として、下記の式（ｖｉ）：

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）　（配列

番号１０３）　　（ｖｉ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、１３～１５アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドである（例、実施例および国際公開第２０１６／１８６２０６号）。

好ましくは、Ｘａａ３、Ｘａａ１、Ｘａａ２、Ｘａａ５、Ｘａａ６、およびＸａａ７のいずれか一つが、リジン残基である。Ｘａａ１は、好ましくは、リジン残基、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、Ｘａａ２は、好ましくは、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基である。

[0102]　特定の実施形態では、ＩｇＧ結合性ペプチドは、下記の式（ｖｉｉ）：

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２

）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－Ｔ　（配列番号１０４）　　（ｖｉｉ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、かつ

Ｔは、スレオニン残基である。〕で表される、１３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドである（例、国際公開第２０１６／１８６２０６号）。好ましくは、Ｘａａ３、Ｘａａ１、およびＸａａ２のいずれか一つが、リジン残基である。Ｘａａ１は、好ましくは、リジン残基、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、Ｘａａ２は、好ましくは、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基である。

[0103] 別の特定の実施形態では、ＩｇＧ結合性ペプチドは、下記の式（ｖｉｉｉ）：

Ｒ－Ｇ－Ｎ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）

（配列番号１０５）　　（ｖｉｉｉ）

〔式中、

Ｒは、アルギニン残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｎは、アスパラギン残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、１３～１５アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチド（例、実施例）。このような特定の構造を有する国際公開第２０１６／１８６２０６号に未開示の化合物は、ヒトＩｇＧ　ＦｃにおけるＥｕ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇに従うＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６残基、あるいはＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６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）。好ましくは、Ｘａａ３、Ｘａａ１、Ｘａａ２、Ｘａａ５、Ｘａａ６、およびＸａａ７のいずれか一つが、リジン残基で

ある。Ｘａａ１は、好ましくは、アルギニン残基、またはロイシン残基であってもよい。あるいは、Ｘａａ１は、好ましくは、リジン残基、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、Ｘａａ２は、好ましくは、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基である。

[0104] ペプチドは、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（Ｃ）残基がジスルフィド結合して環状ペプチドを形成し、各システイン残基のＮ末端側およびＣ末端側には１または２個のシステイン以外の任意のアミノ酸残基を有していても良い。各システイン残基のＮ末端側およびＣ末端側には１または２個のアミノ酸残基を有する場合において、１７アミノ酸残基とした場合、Ｎ末端から１～２、１６～１７番目の各アミノ酸残基は、上記例示のものである。また、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）。

[0105] 上記のとおり、ＩｇＧ結合性ペプチドにおいて、上記Ｘａａのアミノ酸残基が架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基（リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基等のタンパク質構成アミノ酸、あるいはジアミノプロピオン酸残基または２－アミノスベリン酸残基等の非タンパク質構成アミノ酸）である場合、これらのアミノ酸のなかでもリジン残基が好ましい。このような架橋剤としては、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・２ＨＣｌ、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、スベル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’－ｄｉｔｈ

ｉｏｂｉｓｐｒｏｐｉｏｎｉｍｉｄａｔｅ・２ＨＣｌ、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ＳＳ結合を有する架橋剤が挙げられる（例、国際公開第２０１６／１８６２０６号）。ＩｇＧ結合性ペプチドを架橋剤によって修飾する際の部位特異性を高めるため、ＩｇＧ結合性ペプチドは、その配列中にＸａａ１と同じ残基を、全く有さないか、ほとんど有さない（例えば、１個または２個しか有さない）ことが好ましい。例えば、Ｘａａ１がリジン残基である場合には、ＩｇＧ結合性ペプチドは、その配列中にＸａａ１以外の場所にリジン残基を全く有さないか、ほとんど有さないことが好ましい。

[0106] ＩｇＧ結合性ペプチドは、ＩｇＧのＦｃドメインに結合する。ＩｇＧ結合性ペプチドは、上記Ｘａａ１等の上記Ｘａａのアミノ酸残基において、ＩｇＧ　Ｆｃの特定の領域、すなわち、ヒトＩｇＧ　ＦｃにおけるＥｕ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇに従うＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６残基、好ましくはＬｙｓ２４８と近接する（実施例および国際公開第２０１６／１８６２０６号を参照）。あるいは、ＩｇＧ結合性ペプチドにおいて、上記Ｘａａのアミノ酸残基は、ヒトＩｇＧ　ＦｃにおけるＥｕ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇに従うＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６残基以外の他のアミノ酸残基と近接することができる。

[0107] より具体的には、上記式（ｉ）～（ｖｉｉｉ）で表されるペプチドは、以下のとおりである。

（１’）ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号３９）

（２’）ＲＧＮＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号４２）

（３’）ＲＧＮＣＡＷＨＲＧＫＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号４３）

（４’）ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号４４）

（５’）ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号４５）

（６’）ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号４６）

（７’）ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号４７）

（８’）ＤＣＫＷＨＬＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号４８）

（９’）ＤＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号４９）

（１０’）ＤＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号５０）

（１１’）ＤＣＫＷＨＬＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号５１）

（１２’）ＤＣＫＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号５２）

（１３’）ＤＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号５３）

（１４’）ＤＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号５４）

（１５’）ＤＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴ（配列番号５５）

（１６’）ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＱＬＶＷＣＫＹＨ（配列番号５６）

（１７’）ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＥＬＶＷＣＫＹＨ（配列番号５７）

（１８’）ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＫＨ（配列番号５８）

（１９’）ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＫ（配列番号５９）

（２０’）ＲＧＮＣＡＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＫＨ（配列番号６０）

[0108] また、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、

（ａ）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号９２）のアミノ酸配列において、いずれかのアミノ酸残基が、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基（架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基）からなる群より選ばれる１つのアミノ酸残基（好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基、より好ましくはリジン残基）により置換されており、かつ

（ｂ）配列番号９２の前記アミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、親和性ペプチドであってもよい。

[0109] 好ましくは、（ａ）および（ｂ）の特性を有する上記アミノ酸配列は、本明細書中に記載されるようなヒトＩｇＧと結合可能である。

[0110] 配列番号９２のアミノ酸配列からなるペプチドは、ペプチド試薬合成上の都合により、Ｚ３４Ｃとして知られている親和性ペプチドにおいてＮ末端か

ら数えて２６番目と２８番目の２つのＫ（リジン）をＲ（アルギニン）に変更したものであり、さらにＮ末端をアセチル化し、かつＣ末端をアミド化して用いることができる。より具体的には、このような親和性ペプチドとしては、Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号９２）が挙げられる。このような特定の構造を有する親和性物質は、ヒトＩｇＧ　ＦｃにおけるＥｕ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇに従うＬｙｓ２４８残基またはＬｙｓ２４６残基、Ｌｙｓ２８８またはＬｙｓ２９０、Ｌｙｓ３１７、あるいはそれら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）。なお、上記Ｚ３４Ｃのアミノ酸配列は、ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＫＩＫＳＩＲＤＤＣ（配列番号９３）である（例、Ｓｔａｒｏｖａｓｎｉｋ，　Ｍ．　Ａ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　ｍｉｍｉｃｒｙ　ｏｆ　ａ　ｎａｔｉｖｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｂｙ　ａ　ｍｉｎｉｍｉｚｅｄ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｄｏｍａｉｎ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，９４，１００８０－１００８５（１９９７）を参照）。

[0111] 親和性ペプチドは、ヒトＩｇＧ（例、上述したようなヒトＩｇＧ。好ましくはヒトＩｇＧ１）に対する親和性を有することができる。上記親和性ペプチドは、５位および３４位のシステイン残基がジスルフィド結合して環状ペプチドを形成していてもよい。

[0112] 架橋剤によって修飾が容易であるアミノ酸残基が導入される位置としては、ヒトＩｇＧ１等のヒトＩｇＧに対する親和性を有する限り任意の位置を利用することができる。このような位置については、当業者であれば容易に同定することができる。好ましくは、架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基が導入される位置は、ジスルフィド結合していてもよい５位および３４位のシステイン残基以外のアミノ酸残基である。より好ましくは、架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基が導入される位置としては、例えば、１位、３位、６位、７位、１３位、２０位、２４位、３１位、および３２位のアミノ酸残基が挙げられる。

[0113] 好ましくは、（ａ）および（ｂ）の特性を有する上記アミノ酸配列は、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基（架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基）からなる群より選ばれる１つの特定のアミノ酸残基（好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基であり、より好ましくはリジン残基）を所定の位置に有し、かつ、天然タンパク質を構成する通常の２０種のアミノ酸残基（好ましくは、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以外の１７種のアミノ酸残基であり、より好ましくはリジン残基以外の１９種のアミノ酸残基）の変異を当該所定の位置以外の位置に有することもまた好ましい。このような所定の位置は、特に限定されず、例えば、１位、３位、６位、７位、１３位、２０位、２４位、３１位、および３２位が挙げられる。（ａ）および（ｂ）の特性を有する上記アミノ酸配列は、５位および３４位の２つのシステイン残基が維持されており、これらの２つのシステイン残基はジスルフィド結合により結合していてもよい。配列番号９２の前記アミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列は、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（好ましくは置換）により、１～３個（好ましくは１または２個、より好ましくは１個）のアミノ酸残基が改変されたものであってもよい。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。

[0114] より好ましくは、（ａ）および（ｂ）の特性を有する上記アミノ酸配列は、以下（ｃ）または（ｄ）であってもよい。

（ｃ）以下（１）～（９）のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列：

（１）ＫＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号６１）；

（２）ＦＮＭＱＣＱＫＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲ

ＤＤＣ（配列番号６２）；

（３）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＫＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号６３）；

（４）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＫＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号６４）；

（５）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＫＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号６５）；

（６）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ（配列番号６８）；

（７）ＦＮＫＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号７０）；

（８）ＦＮＭＱＣＫＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号７１）；および

（９）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＫＤＣ（配列番号７２）；あるいは

（ｄ）上記（１）～（９）のいずれかのアミノ酸配列において、１つのリジン残基および２つのシステイン残基以外の位置（例、１位、３位、６位、７位、１３位、２０位、２４位、３１位、および３２位の位置）において、リジン残基以外の１９種のアミノ酸残基の変異を有する、上記（１）～（９）のいずれかのアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性（上述したような個数のアミノ酸残基の修飾であってもよい）を有するアミノ酸配列。（ｄ）の上記アミノ酸配列は、５位および３４位の２つのシステイン残基が維持されていることが好ましく、これらの２つのシステイン残基はジスルフィド結合により結合していてもよい。（ｄ）の上記アミノ酸配列を有する親和性ペプチドは、本明細書中に記載されるようなヒトＩｇＧと結合可能であることが好ましい。

[0115] 上記親和性ペプチドは、配列番号９２の前記アミノ酸配列または上記（１）～（９）のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有する限り、架橋

剤によって修飾が容易である１つのアミノ酸残基の導入以外にも、さらなるアミノ酸残基の変異を有していてもよい。さらなるアミノ酸の変異を導入できる位置については、当業者であれば容易に同定することができる。このような位置としては、例えば、５位および３４位のシステイン残基以外の位置を利用することができる。例えば、１位のフェニルアラニン残基、６位のアルギニン残基、１３位のロイシン残基、２０位のグルタミン酸残基、２４位のアスパラギン残基、または３１位のアルギニン残基（架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基が既に導入された位置を除く）であっても利用することができる。さらなるアミノ酸の変異により導入できるアミノ酸としては、例えば、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）が挙げられる。好ましくは、リジン以外のこれらの１９種のアミノ酸が利用されてもよい。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）。

[0116] 配列番号９２の前記アミノ酸配列または（１）～（９）の前記アミノ酸配列に対する同一性％の程度は、上述したとおりに決定することができる。同一性％の程度は、好ましくは９２％以上、より好ましくは９４％以上、さらにより好ましくは９５％以上、特に好ましくは９７％以上（すなわち、配列番号９２のアミノ酸配列に対して、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基からなる群より選ばれる１つのアミノ酸残基の変異のみを有するもの）であってもよい。

[0117] 親和性物質がペプチドである場合、ペプチドの末端にあるアミノ基およびカルボキシ基は、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）、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキル（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）、アリールオキシ基（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。親和性物質が２以上のシステイン残基を含むペプチドである場合、システイン残基の側鎖にあるチオール基を介してジスルフィド結合が形成されていてもよい。

[0118] 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。

[0119] 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., Jounal of American Chemical Society. 132, 1500（2010）.；Bessodes M. et al., Journal of Controlled Release, 99, 423（2004）.；DeSimone, J. M., Journal of American Chemical Society. 132, 17928（2010）；Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187（2003）；Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291（2004））。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（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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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、α－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。

[0123] 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ナート残基が挙げられる。

[0124] 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。

[0125] アルコキシアルキル（すなわち、アルキルオキシアルキル）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。

[0126] 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（エテニル）、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。

[0127] 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ールアルキル残基、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、β－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。

[0128] 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、α－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。

[0129] 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、ヒドロキシルアミン、β－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。

[0130] 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。

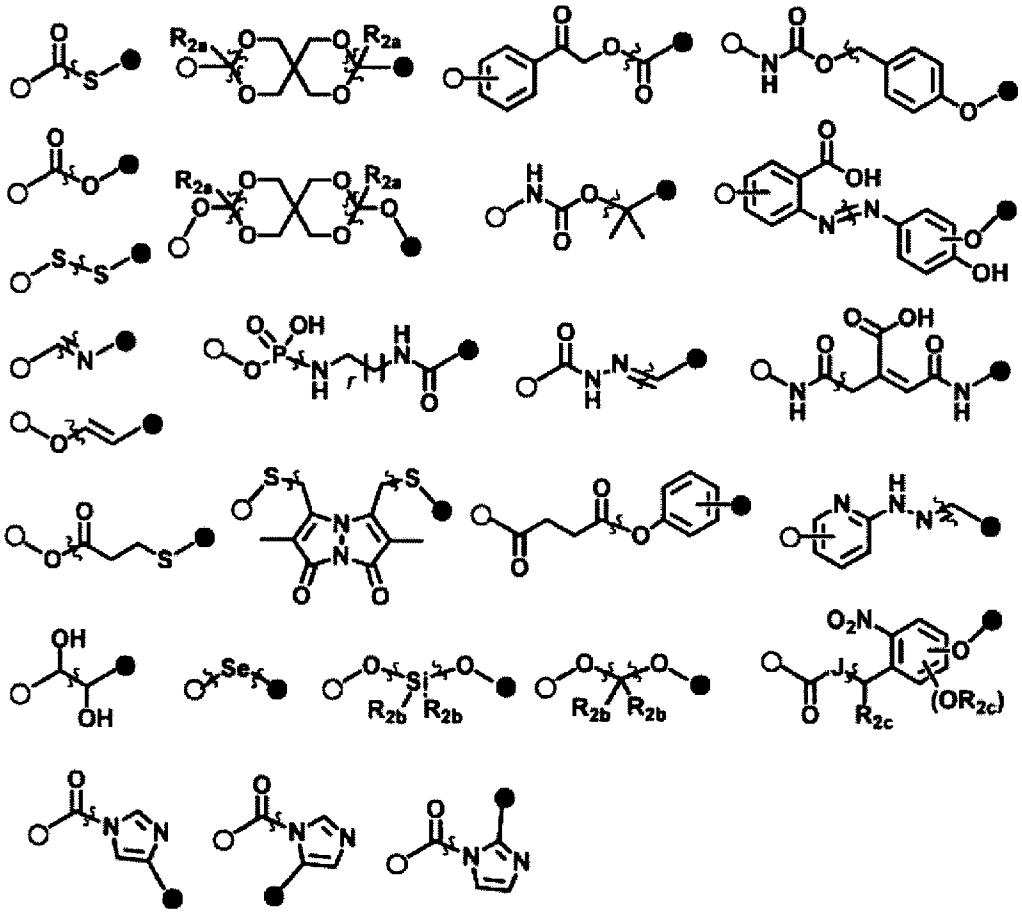
[0131] 酵素としては、例えば、トリプシン、パパイン、ＴＥＶ、トロンビン、カテプシンＢ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カスパーゼ、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、リパーゼ、エンドグリコシターゼ、ＰＮガーゼＦが挙げられる。酵素により切断可能な部位としては、例えば、エステル残基、ホスホジエステル残基、グリコシル残基が挙げられる。

[0132] 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、ビスアリールヒドラゾン残基、ビマンジチオプロピオン酸残基が挙げられる。

[0133] 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。

[0134] 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。

[化30]



〔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、

○（白丸）はＡ（または後述するＬａ）に対する結合を示し、●（黒丸）はＢ（または後述するＬｂ）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、●がＡ（または後述するＬａ）に対する結合を示し、○がＢ（または後述するＬｂ）に対する結合を示していてもよい。〕

[0135] 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。

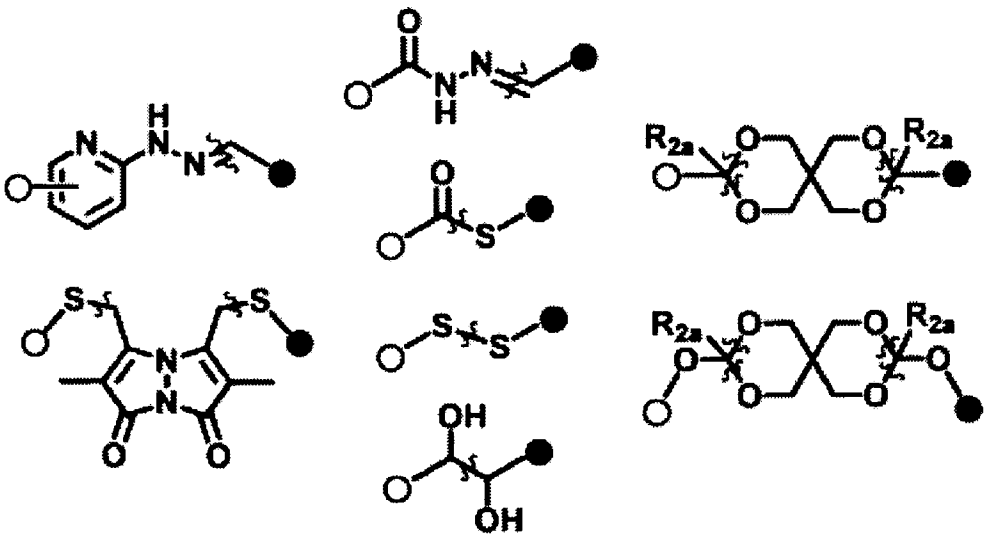
[0136] ｒは、１～４の任意の整数であり、好ましくは１～３の任意の整数であり、より好ましくは１または２である。

[0137] 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。

[0138] （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、ビシナルジオール残基が挙げられる。

[0139] より具体的には、（ｉ）の切断性部分は、例えば、以下：

[化31]



〔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Ｌａ）に対する結合を示し、●（黒丸）はＢ（または後述するＬｂ）に対する結合を示す。

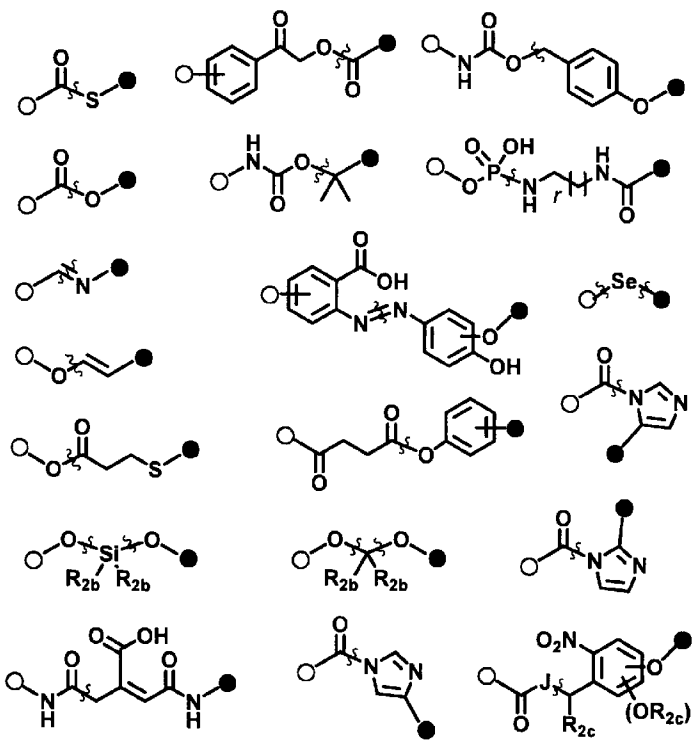
化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がＡ（または後述するＬａ）に対する結合を示し、○がＢ（または後述するＬｂ）に対する

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。

[0140] （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。

[0141] より具体的には、（ｉｉ）の切断性部分は、例えば、以下：

[化32]



〔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Ｌａ）に対する結合を示し、●（黒丸）はＢ（または後述するＬｂ）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、●がＡ（または後述するＬａ）に対する結合を示し、○がＢ（または後述するＬｂ）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。

[0142] 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：

Ｌａ－Ｃ－Ｌｂ （Ｌ１）

Ｌａ－Ｃ （Ｌ２）

Ｃ－Ｌｂ （Ｌ３）

〔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。〕

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 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。

[0150] ２価の芳香族複素環基としては、炭素原子数３～２１の２価の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数３～１５の２価の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数３～９の２価の芳香族複素環基がさらに好ましく、炭素原子数３～６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、ピレンジイル、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、ピロリンジイル、ピペリジンジイル、トリアゾールジイル、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、およびイソキノリンジイルが挙げられる。

[0151] ２価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数３～２１の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数３～１５の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数３～９の非芳香族複素環基がさらに好ましく、炭素原子数３～６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、ピロリンジオンジイル、オキシランジイル、アジリジンジイル、アゼチジンジイル、オキセタンジイル、チエタンジイル、ピロリジンジイル、ジヒドロフランジイル、テトラヒドロフランジイル、ジオキソランジイル、テトラヒドロチオフェンジイル、イミダゾリジンジイル、オキサゾリジンジイル、ピペリジンジイル、ジヒドロピランジイル、テトラヒドロピランジイル、テトラヒドロチオピランジイル、モルホリンジイル、チオモルホリンジイル、ピペラジンジイル、ジヒドロオキサジンジイル、テトラヒドロオキサジンジイル、ジヒドロピリミジンジイル、およびテトラヒドロピリミジンジイルが挙げられる。

[0152] ＬａおよびＬｂ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_aおよびR_b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_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_dR_e－、NR_dR_e－Ｃ（＝Ｏ）－、NR_dR_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、およびカルボキシル基。

[0153] 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。

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] 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。

[0158] 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。

[0159] １価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 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。

[0163] 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。

[0164] 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。

[0165] 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。

[0166] １価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] １価の芳香族複素環基としては、炭素原子数３～１５の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数３～９の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数

３～６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、ピレニル、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、ピロリニル、ピペリジニル、トリアゾニル、プリニル、カルバゾニル、フルオレニル、キノリニル、及びイソキノリニルが挙げられる。

[0171] １価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数３～１５の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数３～９の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数３～６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、ジオキソラニル、テトラヒドロチオフェニル、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。

[0172] 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。

[0173] 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；

（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’）NR_dR_e－、NR_dR_e－Ｃ（＝Ｏ）－、NR_dR_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じ基。

[0174] 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；

（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$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。）；

（ｖ’’）上記（ｖｉｉ）で列挙したものと同じ基。

[0175] 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；

（ｉｉ’’’）炭素原子数１～６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１～６のアルキルを示す。）；または

（ｉｖ’’’）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１～６のアルキルを示す。）；

（ｖ’’’）上記（ｖｉｉ）で列挙したものと同じ基。

[0176] 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；

（ｉｉ’’’’）炭素原子数１～４のアルキル；

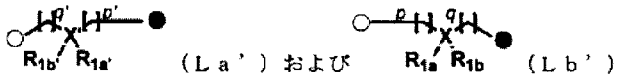
（ｉｉｉ’’’’）R_c－Ｏ－、R_c－Ｃ（＝Ｏ）－、R_c－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、もしくはR_c－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－（R_cは、水素原子、もしくは炭素原子数１～４のアルキルを示す。）；または

（ｉｖ’’’’）NR_dR_e－、NR_dR_e－Ｃ（＝Ｏ）－、NR_dR_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、もしくは炭素原子数１～４のアルキルを示す。）；

（ｖ’’’’）上記（ｖｉｉ）で列挙したものと同じ基。

[0177] 特定の実施形態では、ＬａおよびＬｂは、それぞれ、下記（Ｌａ’）および（Ｌｂ’）：

[化33]



（Ｌａ’）および （Ｌｂ’）

〔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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$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。〕で表されてもよい。

[0178] 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。

[0179] 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。

[0180] 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。

[0181] R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$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_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は、水素原子である。

[0182] 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。

[0183] 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）。

[0184] 親和性物質の標的が可溶性タンパク質である場合、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。

[0185] 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（エテニレン）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、チオエステル基、α－ハロカルボニル残基（例、α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）を含み得るタ

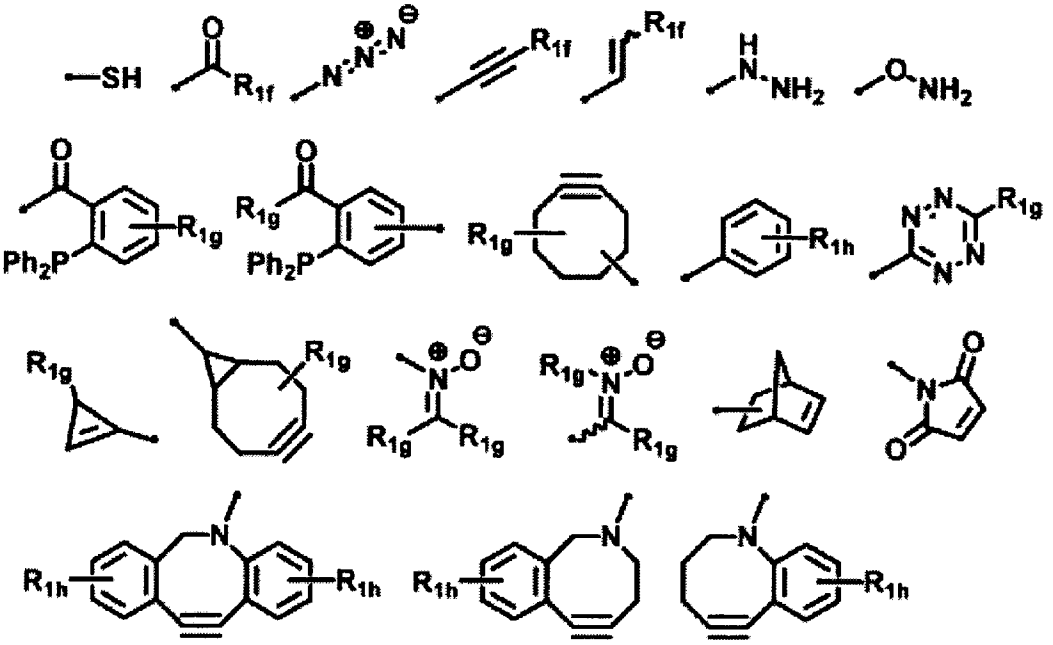
ンパク質（例、抗体以外のタンパク質）、および遊離のチオールを含み得ないタンパク質（例、抗体）が存在する。遊離のチオールを含み得ないタンパク質においては、チオールが生体直交性官能基として機能する。したがって、親和性物質の標的である可溶性タンパク質が遊離のチオールを含み得ないタンパク質（例、抗体）である場合、生体直交性官能基にはチオールが含まれることが好ましい。また、可溶性タンパク質が遊離のチオールを含み得るタンパク質（例、抗体以外のタンパク質）である場合、生体直交性官能基にはチオールが含まれないことが好ましい。１種または２種以上（例、２種、３種、４種）の生体直交性官能基が２価の基に含まれていてもよいが、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。

[0186] 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、チオエステル基、α－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。

[0187] 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、α－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。

[0188] 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。

[化34]



〔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。）

[0189] 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。

[0190] 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。

[0191] 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、チオエステル基、α－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。

[0192] 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、α－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。

[0193] 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。

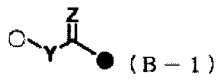
[0194] 生体直交性官能基以外の置換基について、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、１価の複素環基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。

[0195] 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。

[0196] 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。

[0197] 特定の実施形態では、Ｂは、下記式（Ｂ－１）：

[化35]



〔式中、

Ｙは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または下記式（Ｂ－２）：

[化36]



（式中、

ＶおよびＶ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、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、

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$_2$－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。〕で表されてもよい。

[0198] Ｙは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、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$_2$－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$_2$－、または上記式（Ｂ－２）で表される基であってもよい。

[0199] 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。

[0200] ＶおよびＶ’は、－ＮＨ－、－Ｏ－、－CH_2－、または単結合であり、好ましくは－CH_2－、または単結合である。

[0201] 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価の基である。このような２価の基は、上述したものと同様である。

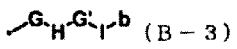
[0202] 好ましくは、Ｖ１における２価の基は、置換されていてもよい２価の炭化水素基、または置換されていてもよい２価の複素環基である。２価の炭化水素基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様であるが、Ｖ１の場合、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、アリーレンが好ましい。例えば、生体直交性官能基を含有する部分で置換されていない場合、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレンが好ましい。一方、生体直交性官能基を含有する部分で置換されている場合、アルキレン、シクロアルキレン、アリーレンが好ましい。これらの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。

[0203] 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。

[0204] さらに特定の実施形態では、Ｖ１は、下記式（Ｂ－３）：

[化37]



〔式中、

ＧおよびＧ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、単結合、または下記式（Ｂ－４）：

[化38]



（式中、

ＷおよびＷ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または単結合であり、

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。

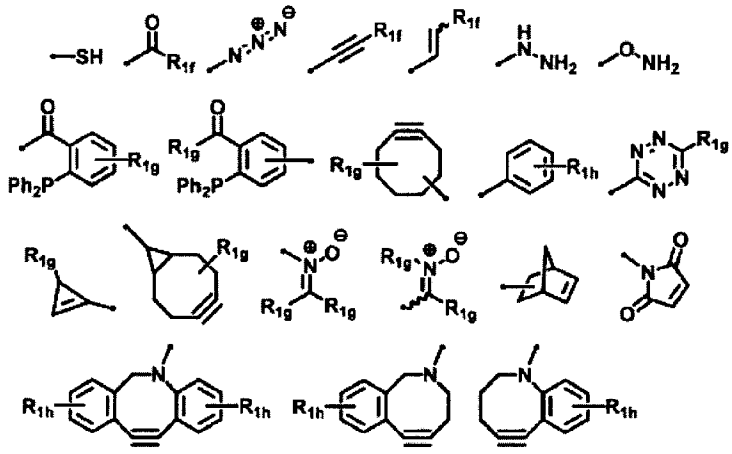
式（Ｂ－４）における○（白丸）は、式（Ｂ－３）における結合手（・）の方向に対する結合を示し、●（黒丸）はｂ側の方向に対する結合を示す。）で表される基であり、

Ｈは、－ＣＨ$_2$－、－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：

[化39]



（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。）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、置換されていてもよい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もよい。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。

[0205] ＧおよびＧ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－CH_2－、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_2－、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_2－、単結合、または上記式（B－4）で表される基であってもよい。

[0206] Hは、－CH_2－、－C＝O－、－C＝S－、－NH－、または単結合である。好ましくは、Hは、－CH_2－、または単結合である。

[0207] 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も、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。

[0208] WおよびW'は、同一または異なって、－NH－、－O－、－CH_2－、または単結合であり、好ましくは－CH_2－、または単結合である。

[0209] 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。

[0210] 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。

[0211] 1－5．反応性基（R）

式（I）において、Rは、可溶性タンパク質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。

[0212] 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。

[0213] 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、可溶性タンパク質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、可溶性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し得ない基のためである。

[0214] 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。

[0215] 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。

[0216] 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。

[0217] 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。

[0218] 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。

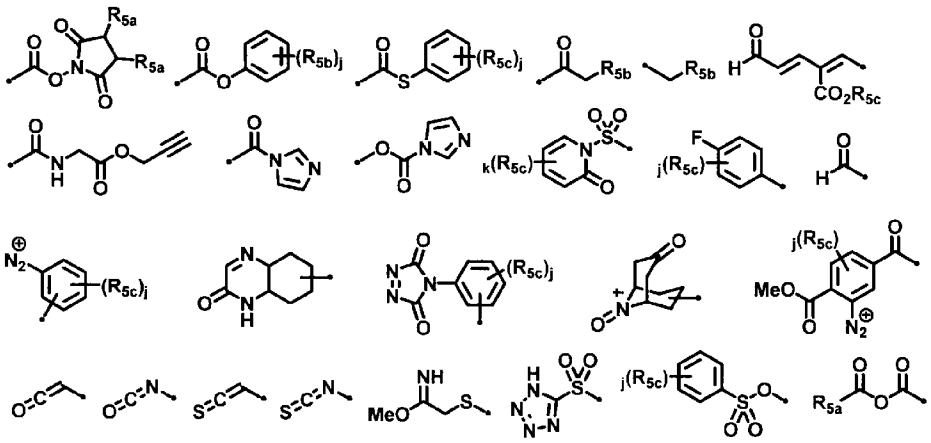
[0219] リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、リジン残基の側鎖中に存在するアミノ基（NH_2）と特異的に反応できる基であり、例えば、活性化エステル残基（例、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド残基）、ビニルスルホン残基、スルホニルクロライド残基、イソシアネート残基、イソチオシアネート残基、アルデヒド残基、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－テトラ酢酸残基、２－イミノ－２－メトキシエチル残基、

ジアゾニウムテレフタル酸残基が挙げられる。

[0220] 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（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。

[0221] 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40]



〔ここで、

R_{5a}およびR_{5c}は、水素原子、または上述した置換基であり、

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。〕

[0222] R_{5a}および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。

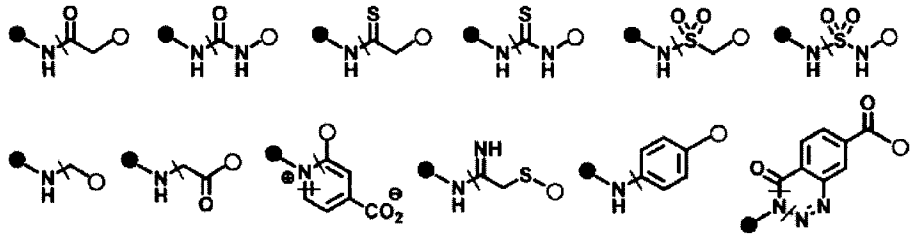
[0223] R_{5b}は、電子吸引基である。このような電子吸引基としては、例えば、上述したものが挙げられるが、ハロゲン原子、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレートが好ましい。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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（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。

[化41]

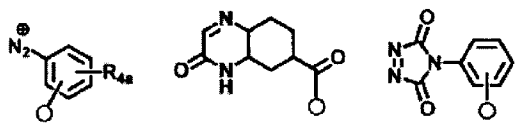


〔ここで、●（黒丸）は、Ｔ側の部分に対する結合を示し、○（白丸）は、Ｂ側の部分に対する結合を示す。結合に直交する直線は、反応により生成する結合を示す。〕

[0227] 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。

[0228] 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42]



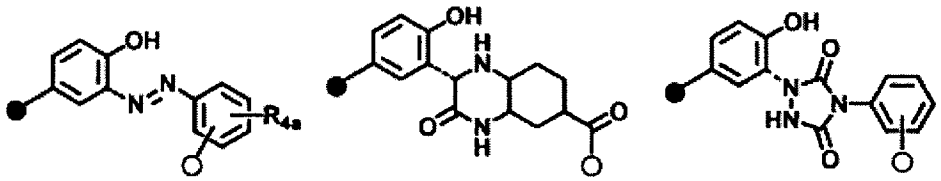
〔ここで、R_{4a}は、水素原子、または上述した置換基であり、○は、Ｂに対する結合を示す。〕

[0229] R_{4a}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。

[0230] 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43]



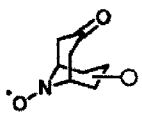
〔ここで、R_{4a}は、水素原子、または上述した置換基であり、●は、Ｔに対する結合を示し、○は、Ｂに対する結合を示す。〕

[0231] R_{4a}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。

[0232] 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－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。

[0233] 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44]

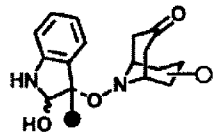


〔ここで、○は、Ｂに対する結合を示す。〕

[0234] 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45]



〔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。〕

[0235] 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。

[0236] 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、可溶性タンパク質および親和性物質の種類、ならびに可溶性タンパク質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、親和性物質が可溶性タンパク質に会合し、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、可溶性タンパク質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。

[0237] ＡおよびＲを連結する主鎖の長さは、可溶性タンパク質およびそれに対す

る親和性物質の種類、ならびに可溶性タンパク質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５Å以上、好ましくは約７．５Å、より好ましくは約１０．５Å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３０Å以下、好ましくは約２３Å以下、より好ましくは約１６．５Å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５．０～３０Å、好ましくは約７．５～２３Å、より好ましくは約１０．５～１６．５Åであってもよい。

[0238] 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（Å）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。

[0239] [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_2-CH_2（Ｃ２）	約１．５
$CH_2-CH_2-CH_2$（Ｃ３）	約３．０
Ｃ４	約４．５
Ｃ５	約６．０
Ｃ６	約７．５
Ｃ７	約９．０
Ｃ８	約１０．５
Ｃ９	約１２．０
Ｃ１０	約１３．５
直鎖アルケニレン	
CH＝CH	約１．５

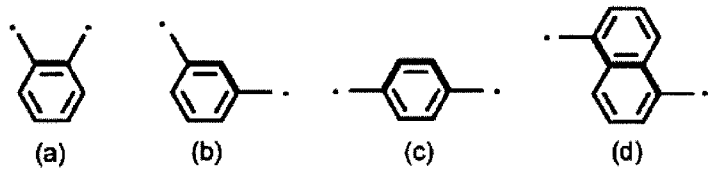
[0240] より具体的には、ＡおよびＲを連結する主鎖の長さは、主鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。主鎖を構成する原子数は、例えば４個（約５．０Å）以上、好ましくは６個（約７．５Å）、より好ましくは８個（約１０．５Å）以上であってもよい。主鎖の原子数はまた、例えば２０個（約３０Å）以下、好ましくは１６個（約２３Å）以下、より好ましくは１２個（約１６．５Å）以下であってもよい。より具体的には、主鎖の原子数は、例えば４～２０個、好ましくは６～１６

個、より好ましくは８～１２個であってもよい。

[0241] 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。

[0242] 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46]



・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。

（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。

[0243] 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。

[0244] １－６－２．部分構造「Ｌ－Ｂ」の具体的構造

上記式（ｌ）において、ＬおよびＢは、互いに連関し得る構造である。したがって、上記式（ｌ）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。

[0245] 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。

[0246] 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。

[0247] 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使用等の観点では、（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。

[0248] 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（ｌ）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。

[0249] 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。

[0250] 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可溶性タンパク質（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。

[0251] 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。

[0252] 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。

Ａ－Ｂ２－Ｌ’－Ｂ１－Ｒ （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、

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。〕

[0253] 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。

[0254] 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：

Ｌａ’－Ｃ’－Ｌｂ’　　（Ｌ１’）

Ｌａ’－Ｃ’　　（Ｌ２’）

Ｃ’－Ｌｂ’　　（Ｌ３’）

〔式中、

Ｌａ’およびＬｂ’は、それぞれ、２価の基であり、

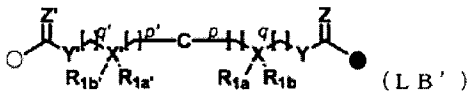
Ｃ’は、切断性部分である。〕

[0255] 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。

[0256] 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。

[0257] 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47]



（ＬＢ’）

〔式中、

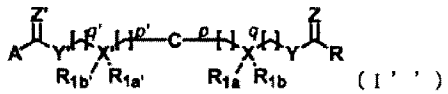
Ｃ、ｐ、ｐ’、ｑ、ｑ’、Ｘ、Ｘ’、R_{1a}、$R_{1a'}$、R_{1b}、$R_{1b'}$、Ｙ、Ｙ’、ＺおよびＺ’の定義、例および好ましい例は、上述したものと同じであり、

○（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。〕

[0258] 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。

[化48]



（Ｉ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ、Ｃ、ｐ、ｐ’、ｑ、ｑ’、Ｘ、Ｘ’、R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$、$R_{1b'}$、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。〕

[0259] 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。

[0260] １－８．製造方法

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含む化合物またはその塩は、適宜調製することができる。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。

[0261] 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。

[0262] 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。

[0263] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質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。可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、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。

[0264] １－９．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（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。

[0265] ２．可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩

２－１．概要

本発明は、式（ＩＩ）で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を提供する。

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕

[0266] ２－２．可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分（Ｒ’）

可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分において、可溶性タンパク質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。可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0267] 好ましくは、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、可溶性タンパク質に含まれ得る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。

[0268] より好ましくは、可溶性タンパク質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。

[0269] さらにより好ましくは、可溶性タンパク質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。

[0270] さらに一層より好ましくは、可溶性タンパク質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部分であってもよい（特に、可溶性タンパク質がヒト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。

[0271] 特に好ましくは、可溶性タンパク質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。

[0272] 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。

[0273] 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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、下記式（ＩＩ’）で表されることができる。

Ａ－Ｂ２－Ｌ’－Ｂ１－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ’）

〔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、

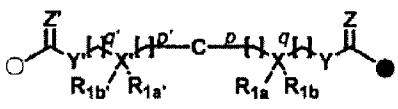
Ｂ１およびＢ２は、同一または異なって、（ａ）生体直交性官能基を含む２価の基、または（ｂ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

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。〕

[0274] 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。

[0275] 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49]



（ＬＢ’）

〔式中、

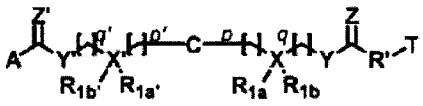
Ｃ、ｐ、ｐ’、ｑ、ｑ’、Ｘ、Ｘ’、R_{1a}、$R_{1a'}$、R_{1b}、$R_{1b'}$、Ｙ、Ｙ

’、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。〕

[0276] 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。

[化50]



（ＩＩ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’、Ｔ、Ｃ、ｐ、ｐ’、ｑ、ｑ’、Ｘ、Ｘ’、R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$、$R_{1b'}$、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。〕

[0277] 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。

[0278] ２－４．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位（位置選択性）

可溶性タンパク質以外の部分構造（例、Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’）は、可溶性タ

ンパク質（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。

[0279] 本明細書において、「位置選択的」または「位置選択性」とは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0280] 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、可溶性タンパク質以外の部分構造は、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。

[0281] ２－５．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質（Ｔ）が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造（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、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0282] 特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、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可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

[0283] 好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、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（可溶性タンパク質）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。

[0284] ２－６．製造方法

本発明は、以下を含む、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ａ１）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含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0285] 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。可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質は、式（ＩＩ）、好ましくは式（ＩＩ’）、より好ましくは式（ＩＩ’’）で表される。

[0286] 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含む化合物またはその塩は、反応性基を有するため、可溶性タンパク質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。

[0287] 反応系において、可溶性タンパク質（Ｘ）に対する、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含む化合物またはその塩（

Ｙ）のモル比率（Ｙ／Ｘ）は、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含む化合物および可溶性タンパク質（例、抗体）の種類、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含む化合物によって修飾されるべき可溶性タンパク質中の部位の数（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。

[0288] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質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、Ｇｌｕ－Ｃ、Ｌｙｓ－Ｎ、Ｌｙｓ－Ｃ、Ａｓｐ－Ｎが挙げられる。可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質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。可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、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。

[0289] ３．可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩

３－１．概要

本発明は、式（ＩＩＩ）で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を提供する。

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩。

[0290] 式（ＩＩＩ）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。

[0291] ３－２．機能性物質（Ｆ）

機能性物質としては、可溶性タンパク質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。

[0292] 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、消化器官系疾患）が挙げられる。可溶性タンパク質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。

[0293] 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、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}Ｈ）、炭素原子の放射性同位体（例、^{14}Ｃ）、リン原子の放射性同位体（例、^{32}Ｐ）、硫黄原子の放射性同位体（例、３５^{S}）、イットリウムの放射性同位体（例、^{90}Ｙ）、テクネチウムの放射性同位体（例、^{99m}Ｔｃ）、インジウムの放射性同位体（例、^{111}Ｉｎ）、ヨウ素原子の放射性同位体（例、^{123}Ｉ、^{125}Ｉ、^{129}Ｉ、^{131}Ｉ）、サマリウムの放射性同位体（例、^{153}Ｓｍ）、レニウムの放射性同位体（例、^{186}Ｒｅ）、アスタチンの放射性同位体（例、^{211}Ａｔ）、ビスマスの放射性同位体（例、^{212}Ｂｉ）が挙げられる。

[0294] 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、βガラクトシダーゼ）、親和性物質（例、ストレプトアビジン、ビオチン、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。

[0295] 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。

[0296] 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２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２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、Ｂにおけるものと同様である。

[0297] 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。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の場合はマレイミドおよびジスルフィドが挙げられ、生体直交性官能基がアルキンの場合はアジドが挙げられ、生体直交性官能基がアルデヒドまたはケトンの場合はヒドラジンが挙げられるが、これらに限定されない。

[0298] 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、機能性物質が可溶性タンパク質である場合、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質の誘導体化は、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可溶性タンパク質を、機能性物質として使用することができる。

[0299] 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可溶性タンパク質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

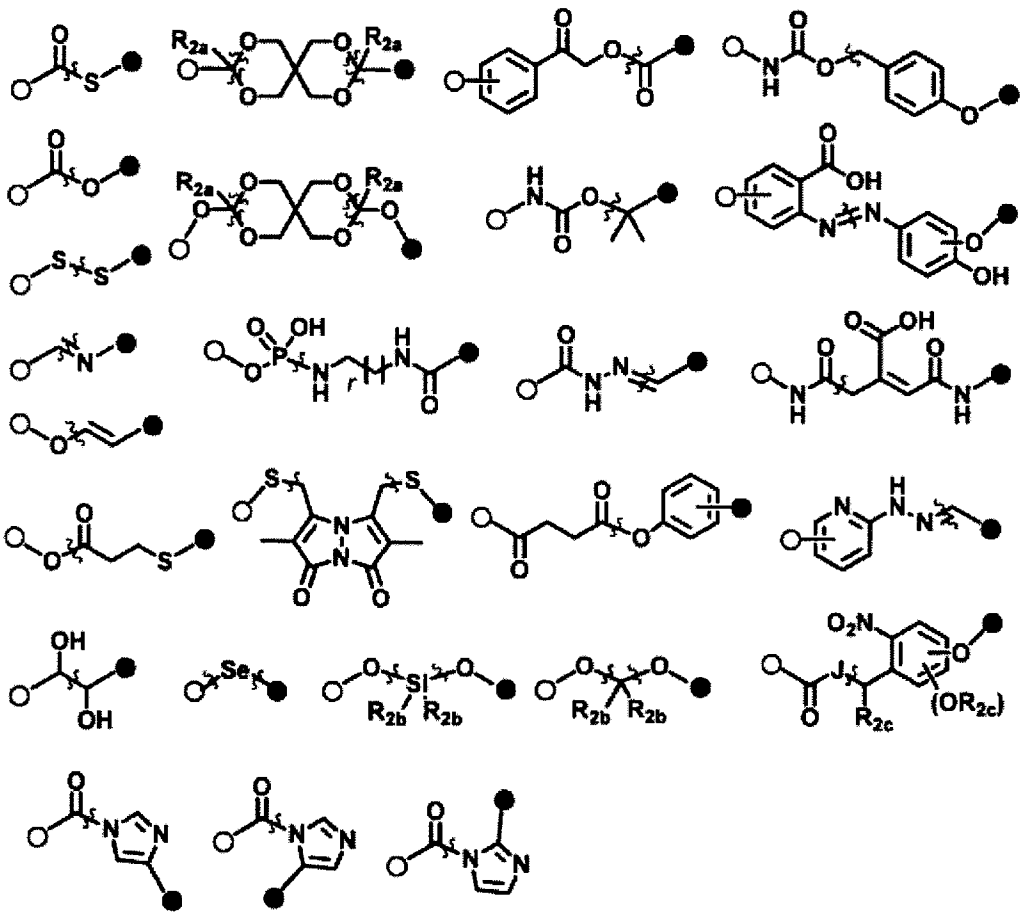
第０２／０８３１８０号、国際公開第０４／０４３４９３号、国際公開第０５／１１２９１９号）。本発明では、誘導体化された機能性物質も、単に「機能性物質」と呼称することができる。

[0300] 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。

[0301] 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、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、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。

[0302] 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価の基はまた、特に限定されるわけではないが、例えば、下記：

[化51]



〔ここで、結合に直交する波線は、反応により生成する結合を示し、

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、上述した水素原子または置換基であり、

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、

○（白丸）はＦ側の部分に対する結合を示し、●（黒丸）はＢ’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Ｂ’側の部分に対する結合を示し、○がＦ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２価の基であってもよい。

[0303] 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。

[0304] 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。

[0305] 特定の実施形態では、切断性リンカーは、上記（ｉｉ）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成する必要がないためである。

[0306] 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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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。

Ａ－Ｂ２’（－Ｆ２）－Ｌ’－Ｂ１’（－Ｆ１）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ’）

〔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２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。〕。

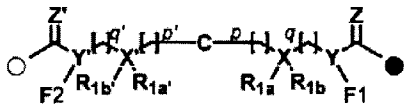
[0307] Ｂ１’およびＢ２’は、同一または異なって、Ｂ’の定義、例および好ま

しい例と同様である。

[0308] 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。

[0309] 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52]



（ＬＢ’（Ｆ）’）

〔式中、

Ｃ、Ｆ１、Ｆ２、ｐ、ｐ’、ｑ、ｑ’、Ｘ、Ｘ’、R_{1a}、$R_{1a'}$、R_{1b}、$R_{1b'}$、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、

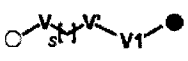
ＹおよびＹ’は、同一または異なって、前記式（Ｂ－１）のＹから水素原子を一つ除いた残基であり、

○（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。〕

[0310] 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。

[0311] 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53]



（Ｂ－２’）

（式中、

ＶおよびＶ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－CH_2－、または単結合であり、

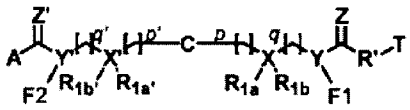
Ｖ１は、（ａ）生体直交性官能基を含む２価の基、または（ｂ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

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－ＣＨ（－）－であってもよい。あるいは、式（Ｂ－２’）では、Ｖ１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－CH_2－のうちの一つが－ＣＨ（－）－であってもよい。

[0312] この場合、上記式（ＩＩＩ）は、下記式（ＩＩＩ’’）として規定することができる。

[化54]



（ＩＩＩ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ、Ｃ、Ｆ１、Ｆ２、ｐ、ｐ’、ｑ、ｑ’、Ｘ、Ｘ’、R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$、$R_{1b'}$、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。〕

[0313] 上記式（ＬＢ’（Ｆ）’）および（ＩＩＩ’’）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。

[0314] ３－５．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位（位置選択性）

可溶性タンパク質以外の部分構造（例、Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’）は、可溶性タンパク質（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、可溶性タンパク質以外の部分構造は、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。

[0315] ３－６．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質（Ｔ）が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造（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（ＩＩＩ）、（ＩＩＩ’）、または（ＩＩＩ’’）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、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0316] 特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、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可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

[0317] 好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、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。

[0318] ３－７．製造方法

本発明は、以下を含む、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｂ１）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること。

[0319] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質は、式（ＩＩ）、好ましくは式（ＩＩ’）、より好ましくは式（ＩＩ’’）で表される。可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、

機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体は、式（ＩＩＩ）、好ましくは式（ＩＩＩ’）、より好ましくは式（ＩＩＩ’’）で表される。

[0320] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、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。

[0321] 反応系において、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩（Ｘ）に対する機能性物質（Ｙ）のモル比率（Ｙ／Ｘ）は、可溶性タンパク質（例、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可溶性タンパク質中の部位の数（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。

[0322] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0323] 本発明はまた、以下を含む、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｂ２）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

を含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；および

（Ｂ３）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること。

[0324] 上記（Ｂ２）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（Ｂ３）の工程は、上記（Ｂ１）の工程と同様にして行うことができる。上記（Ｂ２）および（Ｂ３）の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記（Ｂ２）および（Ｂ３）の工程は、可溶性タンパク質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。

[0325] ４．生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩

４－１．製造方法の概要

本発明は、式（ＩＶ）で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕

[0326] ４－２．（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（Ｌ１）

式（ＩＶ）において、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。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、Ｌ１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、（ｉｉ’）生体直交性官能基を含まない１価の基は、（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の切断により生成し得る１価の基であってもよい。

[0327] 特定の実施形態では、Ｌ１は、下記式（Ｌ１－１）または（Ｌ１－２）のいずれか一つで表されてもよい：

Ｃ１－Ｌｂ　　（Ｌ１－１）

Ｃ１　　（Ｌ１－２）

〔式中、

Ｌｂは、２価の基であり、

Ｃ１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。〕

[0328] 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。

[0329] 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。

[0330] 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。

[0331] 特定の実施形態では、Ｌｂは、下記（Ｌｂ’）：

[化55]


（Ｌｂ’）

〔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、Ｃ１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。

[0332] 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。

[0333] ４－３．部分構造「Ｌ１－Ｂ」

４－３－１．Ｌ１末端部分およびＲ’を連結する部分構造「Ｌ１－Ｂ」の長

さ

式（ＩＶ）において、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（「Ｌ１－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可溶性タンパク質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。

[0334] 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、例えば約２．５Å以上、好ましくは約４Å以上、より好ましくは約５Å以上であってもよい。部分構造の長さはまた、例えば約１５Å以下、好ましくは約１２Å以下、より好ましくは約８Å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２．５～１５Å、好ましくは約４～１２Å、より好ましくは約５～８Åであってもよい。

[0335] 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２．５Å）以上、好ましくは３個（約４Å）以上、より好ましくは４個（約５Å）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１５Å）以下、好ましくは８個（約１２Å）以下、より好ましくは６個（約８Å）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。

[0336] 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。

[0337] 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。

[0338] 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。

[0339] 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可溶性タンパク質を用いて得られる本発明の機能性物質を有する可溶性タンパク質（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。

[0340] 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、互いに連関し得る構造である。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。

[0341] 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。

[0342] 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

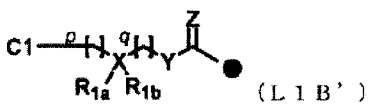
あっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、（ｉ’）における生体直交性官能基は、（ａ）における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、２種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保等、および反応における一部の生体直交性官能基の不使用の観点では、（ｉ’）における生体直交性官能基は、（ａ）における生体直交性官能基と異種であってもよい。

[0343] 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可溶性タンパク質またはその塩は、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。

[0344] 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。

[0345] 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56]



（Ｌ１Ｂ’）

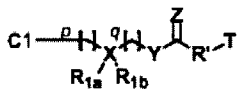
〔式中、

Ｃ１、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、Ｙ、およびＺの定義、例および好ましい例は、上述したものと同じであり、

●（黒丸）は、Ｒ’に対する結合を示す。〕

[0346] 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57]



（ＩＶ’）

〔式中、

Ｃ１、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、Ｙ、Ｚ、Ｒ’、およびＴの定義、例および好ましい例は、上述したものと同じである。〕

[0347] 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。

[0348] ４－４．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位（位置選択性）

可溶性タンパク質以外の部分構造（例、Ｌ１－Ｂ－Ｒ’）は、可溶性タンパク質（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、可溶性タンパク質以外の部分構造は、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。

[0349] ４－５．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質（Ｔ）が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造（例、Ｌ１－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（ＩＶｉ）、（ＩＶ’）、またはＩＶ’’）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、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0350] 特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、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可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

[0351] 好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、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。

[0352] 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可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｃ１）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0353] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質は、式（ＩＩ）、好ましくは式（ＩＩ’）、より好ましくは式（ＩＩ’’）で表される。生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質は、式（ＩＶ）、好ましくは式（ＩＶ’）、より好ましくは式（ＩＶ’’）で表される。

[0354] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、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。

[0355] 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．Ｌｅｒｉｃｈｅ，Ｌ．Ｃｈｉｓｈｏｌｍ，Ａ．Ｗａｇｎｅｒ，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．２０，５７１（２０１２）；Ｆｅｎｇ Ｐ．ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ．１３２，１５００（２０１０）．；Ｂｅｓｓｏｄｅｓ Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，９９，４２３（２００４）．；ＤｅＳｉｍｏｎｅ，Ｊ．Ｍ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃ

hemical Society. 132, 17928 (2010) ; Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187 (2003) ; Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291 (2004)) 。

[0356] 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0357] 本発明はまた、以下を含む、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｃ２）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含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；および

（Ｃ３）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0358] 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。

[0359] ５．機能性物質を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕

[0360] ５－２．部分構造「Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’」

５－２－１．ＦおよびＲ’を連結する部分構造「Ｌ１－Ｂ」の長さ

式（Ｖ）において、ＦおよびＲ’を連結する部分構造「Ｌ１－Ｂ」（「Ｌ１－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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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。

[0361] ＦおよびＲ’を連結する部分構造の長さは、例えば約２．５Å以上、好ま

しくは約４Å以上、より好ましくは約５Å以上であってもよい。部分構造の長さはまた、例えば約１５Å以下、好ましくは約１２Å以下、より好ましくは約８Å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２．５～１５Å、好ましくは約４～１２Å、より好ましくは約５～８Åであってもよい。

[0362] 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２．５Å）以上、好ましくは３個（約４Å）以上、より好ましくは４個（約５Å）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１５Å）以下、好ましくは８個（約１２Å）以下、より好ましくは６個（約８Å）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。

[0363] 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。

[0364] 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。

[0365] 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Ｌ１－Ｂを適宜設計することができる。

[0366] 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、本発明の機能性物質を有する可溶性タンパク質（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。

[0367] ５－２－２．部分構造「Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’」の具体的構造

式（Ｖ）において、Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’におけるＬ１およびＢは、互いに連関し得る構造である。したがって、上記式（Ｖ）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。

[0368] また、Ｆ－（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である。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じである。

[0369] 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。

[0370] 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使用等の観点では、（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。

[0371] 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可溶性タンパク質またはその塩は、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。

[0372] 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。

[0373] 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可溶性タンパク質またはその塩は、式（Ｖ１）または（Ｖ２）で表されてもよい。

[0374] Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ （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’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価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕

[0375] Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ （Ｖ２）

〔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ない２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕

[0376] 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じである。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）。Ｌ１’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を含む２価の基の定義、例および好ましい例は、Ｂ’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を含む２価の基のものと同様であってもよい。

[0377] 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可溶性タンパク質またはその塩は、式（Ｖ３）で表されてもよい。

[0378] Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ （Ｖ３）

〔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２価の基であり、

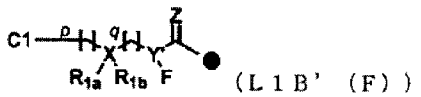
ＦａおよびＦｂは、それぞれ、同一または異なる機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕

[0379] 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（ＦＬ１’Ｂ）で表されてもよい。

[化58]



（Ｌ１Ｂ’（Ｆ））

〔式中、

Ｆ、Ｃ１、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、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、

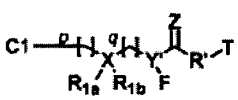
Ｙ’は、前記式（Ｂ－１）のＹから水素原子を一つ除いた残基であり、

●（黒丸）は、Ｒ’に対する結合を示す。〕

[0380] 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。

[0381] したがって、上記式（Ｖ１）は、下記式（Ｖ１’）として規定することができる。

[化59]



（Ｖ１’）

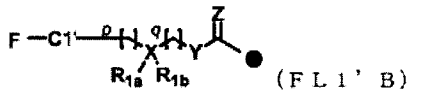
〔式中、

Ｆ、Ｃ１、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、Ｚ、Ｒ’、およびＴの定義、例および好ましい例は、上述したものと同じであり、

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。〕

[0382] 特定の実施形態では、上記式（Ｖ２）において、Ｆ－Ｌ１’－Ｂで表される構造単位は、下記式（ＦＬ１’Ｂ）で表されてもよい。

[化60]



（ＦＬ１’Ｂ）

〔式中、

Ｆ、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、Ｙ、およびＺの定義、例および好ましい例は、上述したものと同じであり、

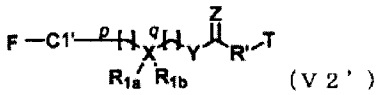
Ｃ１’は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

●（黒丸）は、Ｒ’に対する結合を示す。〕

[0383] Ｃ１’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。Ｃ１’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「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２価の基（Ｂ’）」で述べたものと同様である（以下同様）。

[0384] したがって、上記式（Ｖ２）は、下記式（Ｖ２’）として規定することができる。

[化61]



（Ｖ２’）

〔式中、

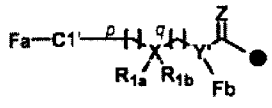
Ｆ、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、Ｙ、Ｚ、Ｒ’、およびＴの定義、例および

好ましい例は、上述したものと同じであり、

Ｃ１’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。〕

[0385] 特定の実施形態では、上記式（Ｖ３）において、Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）で表される構造単位は、下記式（ＦａＬ１’Ｂ’（Ｆｂ））で表されてもよい。

[化62]



（ＦａＬ１’Ｂ’（Ｆｂ））

〔式中、

Ｆａ、Ｆｂ、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、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り、

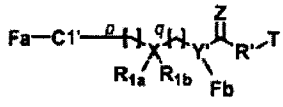
Ｃ１’は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

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。〕

[0386] したがって、上記式（Ｖ３）は、下記式（Ｖ３’）として規定することができる。

[化63]



（Ｖ３’）

〔式中、

Ｆａ、Ｆｂ、ｐ、ｑ、Ｘ、R_{1a}、R_{1b}、Ｚ、Ｒ’、およびＴの定義、例および好ましい例は、上述したものと同じであり、

Ｃ１’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。〕

[0387] 上記式（Ｌ１Ｂ’（Ｆ））、（ＦＬ１’Ｂ）、および（ＦａＬ１’Ｂ’（Ｆ２））、ならびに（Ｖ１’）、（Ｖ２’）および（Ｖ３’）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。

[0388] ５－３．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位（位置選択性）

可溶性タンパク質以外の部分構造（例、Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’）は、可溶性タンパク質（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、可溶性タンパク質以外の部分構造は、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。

[0389] ５－４．可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質（Ｔ）が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造（

例、Ｆ－（Ｌ１－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（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、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0390] 特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、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可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

[0391] 好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、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。

[0392] ５－５．製造方法

本発明は、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。本製造方法は、（Ｄ）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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。

[0393] （Ｄ）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0394] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体は、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可溶性タンパク質は、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。

[0395] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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。

[0396] 機能性物質を有する可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0397] 本発明はまた、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｄ２）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること；および

（Ｄ３）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0398] 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。

[0399] 本発明はさらに、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｄ４）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含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；

（Ｄ５）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること；および

（Ｄ６）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0400] 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。

[0401] （Ｅ）生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0402] 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質は、式（ＩＶ）、好ましくは式（ＩＶ’）で表される。機能性物質を有する可溶性タンパク質は、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。

[0403] 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質はまたはその塩は、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。

[0404] 機能性物質を有する可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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。

[0405] 本発明はまた、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｅ２）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質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

有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0406] 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。

[0407] 本発明はさらに、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

（Ｅ４）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含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；

（Ｅ５）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

[0408] 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。

[0409] ６．生体直交性官能基を位置特異的に有する特定の可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法

本発明はまた、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を提供する。生体直交性官能基を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、可溶性タンパク質が、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、かつ生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である。

[0410] 特定の実施形態では、生体直交性官能基を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であってもよい。

[0411] 本発明はまた、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

[0412] 従来の方法では、上記のような、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することはできなかったが、本発明者らが開発した方法によれば、このような生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することができる。生体直交性官能基、位置選択性、可溶性タンパク質、標的領域、リンカー等の要件、ならびにＬ１における（ｉ’）および（ｉｉ’）、Ｂにおける（ａ）および（ｂ）、Ｒ’、およびＴ、ならびにそれらの要件の一部の技術要素の定義、例および好ましい例は、上述したもの同様である。製造方法の工程の詳細もまた、位置選択性およびこれに関する技術要素（例、標的領域）を必須の要件としていることを除き、「４．生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法」で述べたものと同様である。

[0413] ７．機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法

本発明はまた、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を提供する。機能性物質を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、可溶性タンパク質が、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、かつ機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である。

[0414] 特定の実施形態では、機能性物質を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつ

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であってもよい。

[0415] 本発明はまた、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

[0416] 従来の方法では、上記のような、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することはできなかったが、本発明者らが開発した方法によれば、このような機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することができる。機能性物質、位置選択性、可溶性タンパク質、標的領域、リンカー等の要件、ならびにＬ１における（

ｉ’）および（ｉｉ’）、Ｂにおける（ａ）および（ｂ）、（Ｌ１－Ｂ）’、Ｆ，Ｒ’、およびＴ、ならびにそれらの要件の一部の技術要素の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様である。製造方法の工程の詳細もまた、位置選択性およびこれに関する技術要素（例、標的領域）を必須の要件としていることを除き、「５．機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法」で述べたものと同様である。

[0417] ８．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－トルエンスルホン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、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。

[0418] ９．用途

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本発明の化合物またはその塩は、例えば、可溶性タンパク質の位置選択的な修飾に有用である。したがって、本発明は、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またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬を提供する。

[0419] 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。

[0420] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を（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）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、例えば、機能性物質を（位置選択的に）有する可溶性タンパク質またはその塩の調製のための中間体として有用である。

[0421] 機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、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。特に、可溶性タンパク質が抗体である場合、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、これらの用途に適している。

[0422] 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可溶性タンパク質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、マンニット、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。

[0423] 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。

[0424] 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な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。

[0425] 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

[0426] 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。

[0427] ［実施例１：ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成］

（１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

（１－１）可溶性タンパク質に対する親和性物質（Ａｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号３９）のペプチド）の合成

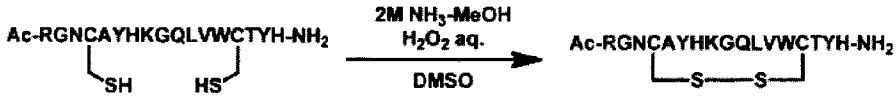
可溶性タンパク質に対する親和性物質であるＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号３９）のペプチドをＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＢｉｏｔａｇｅ社製Ｓｙｒｏ　ｗａｖｅを使用した。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用した。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ，ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）、ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒｅｓｉｎをフィルトレーションにより除去し、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。

[0428] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝３　６９３［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５２０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0429] （１－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号３９）のペプチドにおける４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化64]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0430] （１－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し１００ｍＭとした後、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨを２等量、過酸化水素水を１等量加え室温で１２時間攪拌を行った。反応溶液に０．１％トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し逆相分取クロマトグラフィーで溶出し、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。５ｍｇ～１００ｍｇのスケールでいずれも収率は９０％以上であった。

[0431] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝３　６９２［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５１９［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

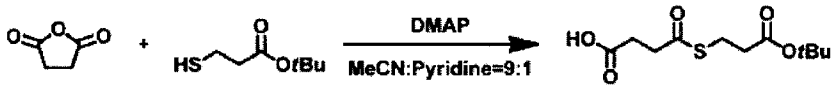
[0432] ［実施例２：切断性リンカーの合成とＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドとの連結］

（２）切断性リンカーの合成とペプチドとの連結

（２－１）チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

（２－１－１）チオエステルリンカーの合成

[化65]

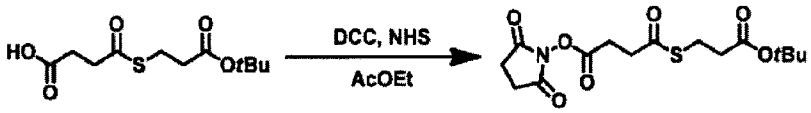


[0433] コハク酸無水物（０．２ｇ，２ｍｍｏｌ）とＮ，Ｎ’－ジメチルアミノピリジン（１２．２ｍｇ，０．１ｍｍｏｌ）をアセトニトリル：ピリジン＝９：１溶媒に溶解させ、アルゴンガスで置換した。ｔｅｒｔ－ブチル－３－スルファニルプロパノエート（０．３ｇ，　２．２ｍｍｏｌ）を加え、室温で１６時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、０．１Ｍ塩酸水溶液、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより４－（３－ｔｅｒｔ－ブトキシ－３－オキソ－プロピル）スルファニル－４－オキソ－ブタン酸（０．４７ｇ，１．８ｍｍｏｌ）を得た。

[0434] ^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，Ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ－ｄ）　δ　３．１２（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），２．９１（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），２．７２（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），２．５５（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），１．４６（ｓ，９Ｈ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：２６３［Ｍ＋Ｈ］$^+$

[0435] [化66]



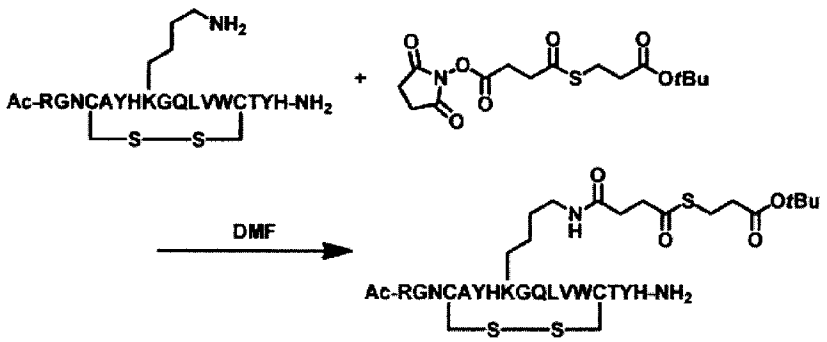
[0436] ４－（３－ｔｅｒｔ－ブトキシ－３－オキソ－プロピル）スルファニル－４－オキソ－ブタン酸（０．４７ｇ，１．８ｍｍｏｌ）に酢酸エチル５ｍＬを加え溶解した。その後、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．３９ｇ，１．９ｍｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．２２ｇ，１．９ｍｍｏｌ）を加え１時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液を

減圧下濃縮することで（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）　４－（３－ｔｅｒｔ－ブトキシ－３－オキソ－プロピル）スルファニル－４－オキソ－ブタノエート（０．６１ｇ，１．７ｍｍｏｌ）を得た。

[0437] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：３６０［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0438] （２－１－２）チオエステルリンカーとペプチドの連結

[化67]

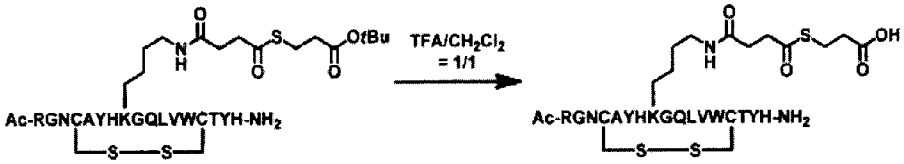


上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0439] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号３９）のペプチド（４２ｍｇ，２０．３μｍｏｌ、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１ｍＬに溶解し、（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）　４－（３－ｔｅｒｔ－ブトキシ－３－オキソ－プロピル）スルファニル－４－オキソ－ブタノエート（０．６１ｇ，１．７ｍｍｏｌ）をアセトニトリル１ｍＬに溶解した溶液中に加えた。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－ｔＢｕ体（４１．７ｍｇ，１８μｍｏｌ）を得た。

[0440] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝３　７７３［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５８０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0441] [化68]

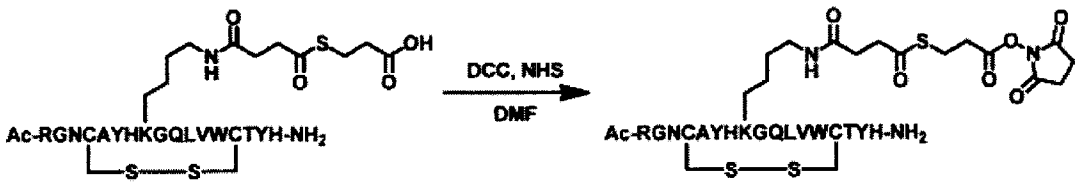


上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0442] 上記ペプチドリンカー連結物（４１．７ｍｇ，１８μｍｏｌ）をジクロロメタン１．０ｍＬ中に溶解し、トリフルオロ酢酸を１．０ｍＬ加え室温中で１時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、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－カルボン酸体（４０．７ｍｇ，１８μｍｏｌ）を得た。

[0443] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝３ ７５５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５６６［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0444] [化69]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

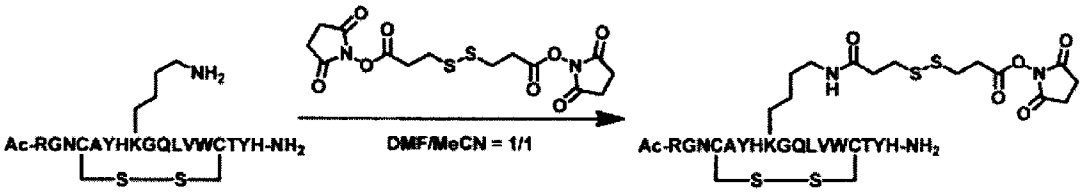
[0445] 上記ペプチドリンカー連結物－カルボン酸体（４０．７ｍｇ，１８μｍｏｌ）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド１ｍＬに溶解し、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（３７．１ｍｇ，０．１８ｍｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（２０．７ｍｇ，０．１８ｍｍｏｌ）を加え１時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液に０．１％トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性

化体（５．２ｍｇ，２．２４μｍｏｌ）を得た。

[0446] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝３　７８７［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５９０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0447] （２－２）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化70]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0448] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号３９）のペプチド（１０ｍｇ，４．８μｍｏｌ、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１ｍＬ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）（０．２ｇ，０．４８ｍｍｏｌ）を１ｍＬに溶解した溶液に加え室温で１２時間攪拌した。０．５％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、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（８．６ｍｇ，３．６３μｍｏｌ）を得た。

[0449] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝３　７８９［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５９２［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0450] （２－３）アセタールリンカーの合成とペプチドの連結

（２－３－１）アセタールリンカーの合成

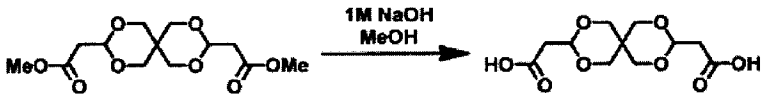
[化71]



[0451] ペンタエリトリトール（１．９８ｇ，１４．３ｍｍｏｌ）、ジメトキシプロピオン酸メチル（６．０ｇ，３１．７ｍｍｏｌ）とｐ－トルエンスルホン酸・一水和物（３３．０ｍｇ，０．１４３ｍｍｏｌ）を混合し、１３０℃で１６時間攪拌した。１６時間後室温に戻し、析出した結晶をろ過により回収しメチル　２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］アセテート（３．０４ｇ，１０ｍｍｏｌ）を得た。

[0452] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：３０５［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0453] [化72]

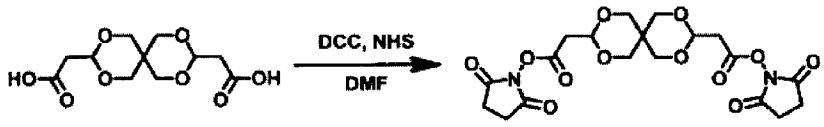


[0454] メチル　２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］アセテート（５０ｍｇ，０．１６４ｍｍｏｌ）をメタノール１ｍＬに溶解し、氷冷下１Ｍ　ＮａＯＨ　ａｑ．を０．４９ｍＬ加え、室温へと昇温後２時間攪拌した。陽イオン交換樹脂を添加し中性にした後、フィルトレーションにより樹脂を取り除き２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］酢酸（３２ｍｇ，０．１１６ｍｍｏｌ）を得た。

[0455] ^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）　δ　４．８５（ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ，２Ｈ），４．２６（ｄｄ，Ｊ＝１１．３，２．４Ｈｚ，２Ｈ），３．６７－３．６１（ｍ，２Ｈ），３．６０（ｓ，８Ｈ），３．４２（ｄ，Ｊ＝１１．６Ｈｚ，２Ｈ），２．６９－２．５６（ｍ，４Ｈ）．
ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：２７７［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0456]

[化73]



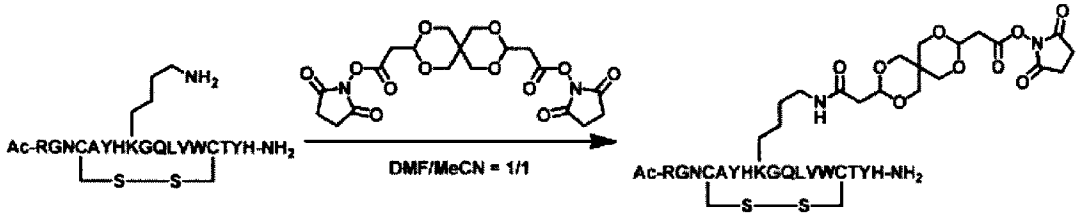
[0457] ２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］酢酸（３２ｍｇ，０．１１６ｍｍｏｌ）を酢酸エチル１ｍＬに溶解し、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（３７．１ｍｇ，０．１８ｍｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（２０．７ｍｇ，０．１８ｍｍｏｌ）を加え１時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液を減圧下濃縮後、水を加え中性のアセトニトリルおよび水を溶媒として逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル） ２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］アセテート（１３ｍｇ，２７．６μｍｏｌ）を得た。

[0458] ^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$） δ ４．７９（ｔ，Ｊ＝５．３Ｈｚ，２Ｈ），４．２４（ｄｄ，Ｊ＝１１．２，２．３Ｈｚ，２Ｈ），３．６０－３．４８（ｍ，４Ｈ），３．３４（ｄ，Ｊ＝１１．５Ｈｚ，２Ｈ），２．３３（ｄ，Ｊ＝５．３Ｈｚ，４Ｈ）．

ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：４７１［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0459] （２－３－２）アセタールリンカーとペプチドの連結

[化74]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0460] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号３９）のペプチド（１０ｍｇ，４．８μｍｏｌ、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１ｍＬに溶解し、（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）　２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］アセテート（１３ｍｇ，２７．６μｍｏｌ）を１ｍＬに溶解した溶液に加え室温で１２時間攪拌した。水を加え中性のアセトニトリルおよび水を溶媒として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、上記ペプチドアセタールリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（８．６ｍｇ，３．６３μｍｏｌ）を得た。

[0461] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝３　８１０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　６０８［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0462] ［実施例３：ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ１　Ｆｃの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析］

（３－１）チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ１　Ｆｃの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

ＩｇＧ１　Ｆｃは、Ｒ＆Ｄ社製　ＩｇＧ１　Ｆｃ，Ｈｕｍａｎ，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ，Ｃａｒｒｉｅｒ－ｆｒｅｅ（製品番号：１１０－ＨＧ－１００）を用いた。実施例２の（２－１）で合成したペプチドチオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し０．４ｍＭとした。ＩｇＧ１　Ｆｃ　１５μｇを０．１Ｍ　酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ４．７）１５μＬに溶解し、０．４ｍＭのペプチド試薬を７μＬ（ＩｇＧ１　Ｆｃに対して５等量）加え、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料のＩｇＧ１　Ｆｃはｍ／ｚ　２８２７０にピーク

が観測され、生成物は結合性ペプチドが一つ導入されたｍ／ｚ　３０５３２にピークが観測された。

[0463] （３－２）ジスルフィドリンカー結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ１　Ｆｃの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

ＩｇＧ１　Ｆｃは、Ｒ＆Ｄ社製　ＩｇＧ１　Ｆｃ，Ｈｕｍａｎ，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ，Ｃａｒｒｉｅｒ－ｆｒｅｅ（製品番号：１１０－ＨＧ－１００）を用いた。実施例２の（２－２）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０．４ｍＭとした。ＩｇＧ１　Ｆｃ　２０μｇを０．１Ｍ　酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ４．７）４０μＬに溶解し、０．４ｍＭのペプチド試薬を１０．７μＬ（ＩｇＧ１　Ｆｃに対して６等量）加え、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料のＩｇＧ１　Ｆｃはｍ／ｚ　２８１８３にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが一つ導入されたｍ／ｚ　３０４１８にピークが観測された。

[0464] （３－３）アセタールリンカー結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ１　Ｆｃの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

ＩｇＧ１　Ｆｃは、Ｒ＆Ｄ社製　ＩｇＧ１　Ｆｃ，Ｈｕｍａｎ，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ，Ｃａｒｒｉｅｒ－ｆｒｅｅ（製品番号：１１０－ＨＧ－１００）を用いた。実施例２の（２－３）で合成したペプチドアセタールリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し０．４ｍＭとした。ＩｇＧ１　Ｆｃ　２０μｇを０．１Ｍ　酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ４．７）４０μＬに溶解し、０．４ｍＭのペプチド試薬を１０．７μＬ（ＩｇＧ１　Ｆｃに対して６等量）加え、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料のＩｇＧ１　Ｆｃはｍ／ｚ　２８１８３にピ

ークが観測され、生成物は結合性ペプチドが一つ導入されたｍ／ｚ　３０５４１にピークが観測された。

[0465] ［実施例４：ＩｇＧ１　Ｆｃ－ペプチド複合体のリンカー切断とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析］

（４－１）チオエステルリンカーの切断とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

０．２Ｍ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．０）、２５ｍＭシステイン溶液４０μＬに、実施例３の（３－１）で合成したＩｇＧ１　Ｆｃ－ペプチドチオエステルリンカー複合体を溶解し、室温で１６時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．０）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料の結合性ペプチドが一つ導入された複合体はｍ／ｚ　３０５４１にピークが観測され、反応後はｍ／ｚ　２８３９７にピークが観測された。

[0466] （４－２）チオエステルリンカーの切断とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

０．２Ｍ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．０）４０μＬに、実施例３の（３－２）で合成したＩｇＧ１　Ｆｃ－ペプチドジスルフィドリンカー複合体を溶解し、１０ｍＭ　Ｄ，Ｌ－ジチオトレイトール　１２．５μＬ（Ｆｃに対して１０等量）を添加し室温で１６時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．０）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料の結合性ペプチドが一つ導入された複合体はｍ／ｚ　３０４１８にピークが観測され、反応後はｍ／ｚ　２８１８３にピークが観測された。

[0467] （４－３）アセタールリンカーの切断とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

任意のバッファー（ｐＨ３．０～ｐＨ６．０）に、実施例３の（３－３）で合成したＩｇＧ１　Ｆｃ－ペプチドアセタールリンカー複合体を溶解し、室温で攪拌することで、アセタール構造が分解し、アルデヒドがＩｇＧ１

Ｆｃ上に残る。これをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定することができる。

[0468] ［実施例５：抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブと抗ＣＤ２０抗体リツキシマブの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳおよびＨＩＣ－ＨＰＬＣによる解析］

（５－１）抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例２の（２－２）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０．４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）２００μＬに溶解させ、０．４ｍＭのペプチド試薬を５０．７μＬ（抗体に対して６等量）を加えて、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－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ｍ／ｚ　１４７５６９にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入されたｍ／ｚ　１５１８４８にピークが観測された。

[0469] （５－２）抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（５－１）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Ｂｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0470] 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＋ペプチド試薬　１２等量（反応後Ａｍｉｃｏｎ１０Ｋにより溶媒置換）；

ｂ：トラスツズマブ＋ペプチド試薬１２等量；

ｃ：トラスツズマブ＋ペプチド試薬６等量；

ｄ：トラスツズマブ原料；

ｅ：ペプチド試薬のみ；

ｆ：ＤＭＦのみ。

[0471] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４１７分はトラスツズマブ原料、１０．９４３分および１３．０６３分はペプチド試薬由来のピーク、０．４４分はＤＭＦであることが分かる（図３、４）。トラスツズマブにペプチド試薬を６等量反応させたところ９．４１７分のピークが消失し、９．９９分および１０．２３７分のピークが出現した（図３、４）。またペプチド試薬を１２等量加えたところ９．９９分のピークが消失したことから、９．９９分のピーク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３、４）。ａをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより解析したところ（５－１）で示したようにｍ／ｚ　１５１８４８のＭＳピークを示したペプチド試薬がトラスツズマブに対して２つ導入されたピークが観測された（図３、４）。

[0472] （５－３）抗ＣＤ２０抗体リツキシマブの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例２の（２－２）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０．４ｍＭとした。抗ＣＤ２０抗体リツキシマブ５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ５．５）２００μＬに溶解させ、０．４ｍＭのペプチド試薬を５０．７μＬ（抗体に対して６等量）を加えて、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料のリツキシマブはｍ／ｚ　１４４００２にピーク

が観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入されたｍ／ｚ　１４８１６９にピークが観測された。

[0473] （５－４）抗ＣＤ２０抗体リツキシマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（５－３）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Ｂｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ　$(NH_4)_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0474] ａ～ｆのサンプルについては以下の条件で反応させた。

ａ：リツキシマブ＋ペプチド試薬　１２等量（反応後Ａｍｉｃｏｎ１０Ｋにより溶媒置換）；

ｂ：リツキシマブ＋ペプチド試薬１２等量；

ｃ：リツキシマブ＋ペプチド試薬６等量；

ｄ：リツキシマブ原料；

ｅ：ペプチド試薬のみ；

ｆ：ＤＭＦのみ。

[0475] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４１７分はリツキシマブ原料、１０．９４分および１３．０２分はペプチド試薬由来のピーク、０．４４分はＤＭＦであることが分かる（図５、６）。リツキシマブにペプチド試薬を６等量反応させたところ１０．３６分のピークが消失し、１０．７６３分および１０．９４分のピークが出現した（図５、６）。またペプチド試薬を１２等量加えたところ１０．７６３分のピークが消失したことから、１０．７６３分のピークはペプチドがリツキシマブに１個導入された化合物であると考えられる（図５、６）。ａをＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより解析したところ（

５－１）で示したようにｍ／ｚ　１４８１６９のペプチド試薬がリツキシマブに対して２つ導入されたピークが観測された（図５、６）。

[0476] ［実施例６：トラスツズマブ・ペプチド複合体およびリツキシマブ・ペプチド複合体の切断、および再酸化、およびそれらの生成物のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳとＲＰ－ＨＰＬＣによる解析］

（６－１）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ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

先ず、実施例５の（５－１）で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体４００μｇを６０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ８．０）に溶解し、７２μＭとした後、２０ｍＭ　Ｄ，Ｌ－ジチオトレイトール　１０．０μＬ（トラスツズマブ・ペプチド複合体に対して６０等量）を添加し室温で１６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。

[0477] 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１８μＭとした後、１０ｍＭ　デヒドロアスコルビン酸　６．４μＬ（トラスツズマブ・ペプチド複合体に対して２０等量）加えて３時間攪拌することにより、再酸化を行った。ＭＡＬＤＩ－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ｍ／ｚ　１４５３２９にピークが観測された。

[0478] （６－２）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により得られる生成物のＲＰ－ＨＰＬＣによる解析

（６－１）の反応をＲＰ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＴＳＫ　ｇｅｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃ４－３００（ＴＯＳＯＨ）　４．６ｘ１５０ｍｍ　３．０μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１％　ＴＦＡ、Ｂ＿Ｂｕ

ｆｆｅｒ：０．１％　ＴＦＡ，８０％　ＡＣＮにて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ２０→６０％，２０ｍｉｎ（データ採取３０ｍｉｎ）、カラム温度は６０℃、サーモスタット温度は１０℃、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0479] ａ～ｆのサンプルについては以下の条件で反応させている。

ａ：トラスツズマブ；

ｂ：トラスツズマブ＋ペプチド試薬６等量；

ｃ：トラスツズマブをＤＴＴにより還元；

ｄ：ｂｕｆｆｅｒ　ｐＨ８．０，抗体濃度７２μＭでＤ，Ｌ－ジチオトレイトールにより還元；

ｅ：ｄをデヒドロアスコルビン酸により再酸化３時間後；

ｆ：ｄをデヒドロアスコルビン酸により再酸化２４時間後。

[0480] ｂ、ｄ、およびｅまたはｆの順番で反応しており、軽鎖と重鎖に分解した後（ｄ）、デヒドロアスコルビン酸により再酸化しｅまたはｆになった（図７）。また、ピークのＲｅｔｅｎｔｉｏｎ　Ｔｉｍｅから、トラスツズマブの軽鎖と修飾体の軽鎖が同じ位置にでてきており、重鎖のリテンションタイムがずれていることから、重鎖が修飾されていることが分かる（図７）。

[0481] （６－３）リツキシマブ・ペプチド複合体のリンカー切断とＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例５の（５－３）で合成したリツキシマブ・ペプチド複合体４００μｇを６０ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ８．０）に溶解し、７２μＭとした後、２０ｍＭ　Ｄ，Ｌ－ジチオトレイトール　１０．０μＬ（リツキシマブ・ペプチド複合体に対して６０等量）を添加し室温で１６時間攪拌した。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、濃度を１８μＭとした後、１０ｍＭ　デヒドロアスコルビン酸６．４μＬ（リツキシマブ・ペプチド複合体に対して２０等量）加えて３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。ＭＡＬＤＩ－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ｍ／ｚ　１４４７８３にピークが観測された。

[0482] ［実施例７：トラスツズマブおよびリツキシマブのチオール導入体への蛍光標識と蛍光標識率の算出］

（７－１）トラスツズマブのチオール導入体への蛍光標識と蛍光標識率の算出

実施例６の（６－１）で合成した、トラスツズマブのチオール導入体を２０ｍＭ　ＰＢＳバッファーに溶解し０．３ｍＭとした後、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ製　ＤｙＬｉｇｈｔ５５０（０．９４ｍＭ、ＤＭＦに溶解）を２０μＬ添加し、室温で１２時間攪拌した。反応後、Ｄｙ　Ｒｅｍｏｖａｌ　Ｃｏｌｕｍｎにより蛍光色素を除去した。ＢＥＣＫＭＡＮ　ＣＯＵＬＴＥＲ製ＤＵ　８００　ＳＰＥＣＴＲＯＰＨＯＴＯＭＥＴＥＲにより２８０ｎｍと５５７ｎｍの吸光度を測定した。吸光度より、蛍光標識率を算出したところ、２であった。

[0483] （７－２）リツキシマブのチオール導入体への蛍光標識と蛍光標識率の算出

実施例６の（６－３）で合成した、リツキシマブのチオール導入体を２０ｍＭ　ＰＢＳバッファーに溶解し０．３ｍＭとした後、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ製　ＤｙＬｉｇｈｔ５５０（０．９４ｍＭ、ＤＭＦに溶解）を２０μＬ添加し、室温で１２時間攪拌した。反応後、Ｄｙ　Ｒｅｍｏｖａｌ　Ｃｏｌｕｍｎにより蛍光色素を除去した。ＢＥＣＫＭＡＮ　ＣＯＵＬＴＥＲ製ＤＵ　８００　ＳＰＥＣＴＲＯＰＨＯＴＯＭＥＴＥＲにより２８０ｎｍと５５７ｎｍの吸光度を測定した。吸光度より、蛍光標識率を算出したところ、２であった。

[0484] ［実施例８：ＩｇＧ１　Ｆｃおよび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］

（８－１）ＩｇＧ１　Ｆｃおよびトラスツズマブ、リツキシマブのチオール導入体のトリプシン処理

１．５ｍＬ低吸着マイクロテストチューブに８Ｍ尿素を含む１００ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を４０μＬ分注し、サンプル溶液を１２μＬ、１

００ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解した２％のＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸ（プロテアーゼ消化促進剤　ＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸ™ Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ）を２μＬ加え、撹拌、混合した。その後、２０ｍＭのジチオスレイトール水溶液　２０μＬを加えて６５℃で１５分間加温後、３０ｍＭのヨード酢酸水溶液　４２μＬを添加し、遮光下室温で３０分間反応させた。反応後、１００ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を１５０μＬ加えて撹拌し、１００ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解した２％のＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸを１．４μＬ加え、１００μｇ／ｍＬのトリプシン水溶液（Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　Ｇｒａｄｅ，　Ｃｏｄｅ　Ｎｏ．Ｔ６５６７－５ｘ２０μｇ（ＳＩＧＭＡ））を１０μＬ添加して３７℃で１８時間酵素消化した。消化後、１０％トリフルオロ酢酸水溶液１５μＬ、２％アセトニトリルを含む０．０１％トリフルオロ酢酸水溶液を４．６μＬ加え、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定に使用した。

[0485] （８－２）ＩｇＧ１　Ｆｃおよびトラスツズマブのチオール導入体のＧｌｕ－Ｃ処理

１．５ｍＬ低吸着マイクロテストチューブに８Ｍ　尿素を含む１００ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を２０μＬ分注し、サンプル溶液を８μＬ加え、撹拌、混合した。その後、１００ｍＭのジチオスレイトール水溶液５μＬを加えて６５℃で１５分間加温後、２００ｍＭヨード酢酸水溶液６μＬを添加し、遮光下室温で３０分間反応させた。反応後、１００ｍＭのジチオスレイトール水溶液２μＬを加え、さらに、１００ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を３μＬ加えて撹拌し、２００μｇ／ｍＬのＧｌｕ－Ｃ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ水溶液（Ｐｉｅｒｃｅ™ Ｇｌｕ－Ｃ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ，ＭＳ　Ｇｒａｄｅ、製品番号：９００５４）を５μＬ添加して３７℃で１８時間酵素消化した。消化後、１０％トリフルオロ酢酸水溶液４μＬ加え、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定に使用した。

[0486] （８－３）ＩｇＧ１　Ｆｃおよびトラスツズマブの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）

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）

[0487]（ＨＰＬＣ分析条件）

トラップカラム：Ａｃｃｌａｉｍ　ＰｅｐＭａｐ（登録商標）　１００，７５μｍｘ２ｃｍ，ｎａｎｏＶｉｐｅｒ（サーモフィッシャーサイエンティフィック）

分析カラム：ＥＳＩ－ｃｏｌｕｍｎ（ＮＴＣＣ－３６０／７５－３－１２５，７５μｍ×１２．５ｃｍ，３μｍ（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：３００ｎＬ／ｍｉｎ

サンプル注入量：２μＬ（ＩｇＧ１　Ｆｃ）、３μＬ（トラスツズマブ）

グラジエント条件（Ｂ％）：２％（０．０－０．５分）、２％→４５％（０．５－３３．５分）、４５％→７５％（３３．５－３５．５分）、７５％（３５．５－４５．０分）

[0488]（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　Ａｑｕｉｓｉｔｉｏｎ

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）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）を用いて行った。

[0489] （８－４）ＩｇＧ１　Ｆｃおよび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）を用いて行った。

[0490] Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｅｒでの解析は、ＳｅｑｕｅｓｔＨＴ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３５０～５０００Ｄａとした。また、消化酵素に関しては、サンプルに合わせ、トリプシンまたはＧｌｕ－Ｃを消化酵素として設定し、Ｍａｘｉｍｕｍ　Ｍｉｓｓｅｄ　Ｃｌｅａｖａｇｅ　Ｓｉｔｅｓは０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１０ｐｐｍおよび０．５Ｄａとした。Ｓｔａｔｉｃ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎにはヨード酢酸によるシステイン残基の修飾として、Ｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ（＋５８．００５Ｄａ）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（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ）を設定した。

[0491] 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８に示される（１）～（３）を用いた。

[0492] （８－５）ＩｇＧ１　Ｆｃおよびトラスツズマブの 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（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ））を含むアミノ酸２６残基からなるペプチド、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ（配列番号５）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　９９８．１４８７４、理論値：９９８．１４８５９、３価）が観測され（図９）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４６位のリジン残基の修飾を示す、２価のｂ２４に相当するｍ／

ｚ　１３７５．５９（理論値：１３７５．１４）のプロダクトイオンが確認された（図１０）。また、トラスツズマブのＧｌｕ－Ｃ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ））を含むアミノ酸１６残基からなるペプチド、ＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤ（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　９２９．４９５７３、理論値：９２９．４９５２７、２価）が観測され（図１１）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４８位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ３に相当するｍ／ｚ　５０５．２２（理論値：５０５．２０）のプロダクトイオンが確認された（図１２）。

[0493] さらに、ＩｇＧ１　Ｆｃのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ））を含むアミノ酸２６残基からなるペプチド、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＥＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ（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　９９４．１２８８５、理論値：９９４．１２４３３、３価）が観測され（図１３）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４６位のリジン残基の修飾を示す、２価のｂ２４に相当するｍ／ｚ　１３６９．１６（理論値：１３６９．１０）のプロダクトイオンが確認された（図１４）。また、ＩｇＧ１　ＦｃのＧｌｕ－Ｃ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるＣａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ化を受けたチオール導入体（＋１４６．００４Ｄａ））を含むアミノ酸２３残基からなるペプチド、ＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥ（配列番号８）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　８９２．１２６０４、理論値：８９２．１２６１１、３価）が観測され（図１５）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４８位のリジン残基の修飾を示す、２価のｂ１２に相当するｍ／ｚ　６２０．２７（理論値：６１９．８５）のプロダクトイオンが確認された（図１６）。

以上より、ＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４６位および２４８位のリジン残基を含むペプチドフラグメントへの修飾が確認された（図９～１６）。

[0494] ［実施例９：位置選択的トラスツズマブ－ＤＭ１コンジュゲートの合成、および平均ＤＡＲの解析］

（９－１）位置選択的Ｔ－ＤＭ１＊（トラスツズマブ－ＤＭ１）コンジュゲートの合成

実施例６の（６－１）で合成した生体直行性官能基が二つ導入された化合物０．３５ｍｇを２００μＬの１００ｍＭ　ＰＢＳ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡバッファーに溶解させ、１．７５ｍｇ／ｍＬとしたのち、１０μＬのＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドとＤＭ－１（Ａｂｚｅｎａ社製）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し５ｍＭとしたものを４．８μＬ添加し２０℃で２時間攪拌した。２時間後、Ｎ－アセチルシステインを１００ｍＭ　ＰＢＳ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡバッファーに溶解させて５０ｍＭとしたものを１μＬ添加しさらに２０℃で１時間攪拌した。反応後、ＮＡＰ－５カラムにより抽出し、ＤＭ－１を取り除いた。

[0495] （９－２）ＳｏｌｏＶＰＥによる反応後の抗体濃度測定

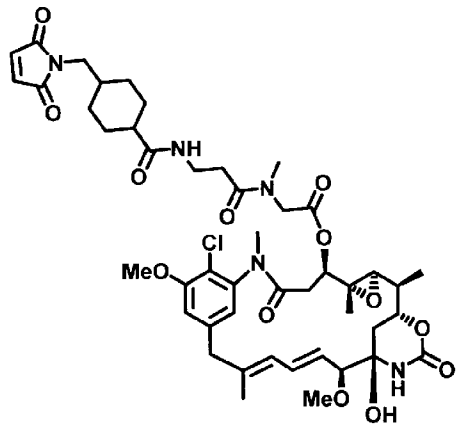
２８０ｎｍの波長で吸光度を測定し、モル吸光係数より抗体濃度を算出したところ、０．４８ｍｇ／ｍＬであった。溶液量は０．７ｍＬであったので、収量は０．３３６ｍｇと算出できる。

[0496] （９－３）Ｑ－ＴＯＦＭＳによるＤＡＲの算出

Ｑ－ＴＯＦＭＳはアジレント社製のＡｇｉｌｅｎｔ　６５５０　ｃｏｕｐｌｅｄ　ｔｏ　Ａｇｉｌｅｎｔ　１２９０　ＵＰＬＣ　ｗｉｔｈ　ＤＡＤ　ｄｅｔｅｃｔｏｒ，　Ａｕｔｏｓａｍｐｌｅｒ　ｃｏｏｌｉｎｇ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒｍｏｓｔａｔｔｅｄ　ｃｏｌｕｍｎ　ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔを使用した。ソフトウェアはＭａｓｓＨｕｎｔｅｒを使用し、ＤＡＲを算出した。生成物はＤＭ－１が２つ導入された１４９９４５にピークが観測され、平均ＤＡＲは２と算出された（図２３）。

[0497] 本実施例で用いたＤＭ１＊は、以下である。

[化75]



Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｆｏｒｍｕｌａ： Ｃ４６Ｈ６０ＣｌＮ５Ｏ１３

Ｅｘａｃｔ Ｍａｓｓ： ９２５．３８７６

[0498] ［実施例１０：Ｂｉａｃｏｒｅによる結合性評価］

（１０－１）ＥＬＩＳＡによる抗原ＨＥＲ２への結合性評価

実施例９の（９－１）で合成した位置選択的Ｔ－ＤＭ１（トラスツズマブ－ＤＭ１）コンジュゲートの抗原ＨＥＲ２への結合性をＥＬＩＳＡにより評価した。コントロールとしてカドサイラ（Ｔ－ＤＭ１）も評価した。その結果、カドサイラの解離定数（ＫＤ値）は６．３７２±０．７６ｐＭであり、位置選択的Ｔ－ＤＭ１（トラスツズマブ－ＤＭ１）コンジュゲートは６．６８４±０．１７ｐＭであった。したがって、本手法により合成されたＡＤＣは抗原結合性を維持していると考えられる。

[0499] （１０－２）ＢｉａｃｏｒｅによるＦｃＲｎへの結合性評価

実施例９の（９－１）で合成した位置選択的Ｔ－ＤＭ１（トラスツズマブ－ＤＭ１）コンジュゲートのｎｅｏｎａｔａｌ Ｆｃ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦｃＲｎ）への結合性をＥＬＩＳＡにより評価した。抗体のＦｃＲＮへの結合性がより高い場合、抗体がより長い血中半減期を有することが知られている。コントロールとしてカドサイラ（Ｔ－ＤＭ１）も評価した。その結果、カドサイラの解離定数（ＫＤ値）は１．６５±０．０５μＭであり、位置選

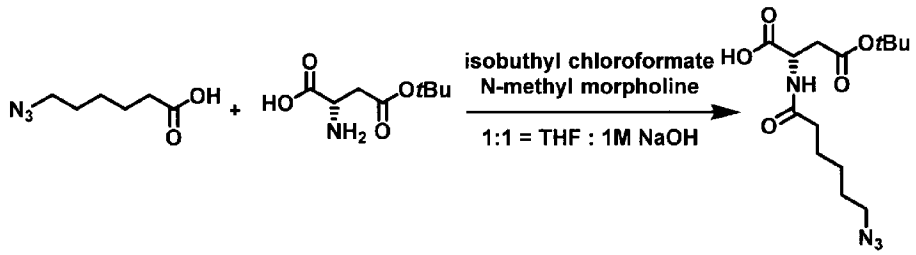
択的Ｔ－ＤＭ１（トラスツズマブ－ＤＭ１）コンジュゲートは０．２５８±０．００１μＭであった。したがって、本手法により合成されたＡＤＣはＦｃＲｎ結合性を維持していると考えられ、既存のＡＤＣであるカドサイラよりも６倍程度ＦｃＲｎへの親和性が高くなっていることが分かった。

[0500] ［実施例１１：（１）種々の切断性リンカーの合成、ならびに（２）合成したリンカーとＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドとの連結による、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－アジド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体、ペプチド－マレイミド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体、ペプチド－アジド修飾エステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体、およびペプチドアセタールリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）の合成］

（１１－１）チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

（１１－１－１）チオエステルリンカーの合成

[化76]



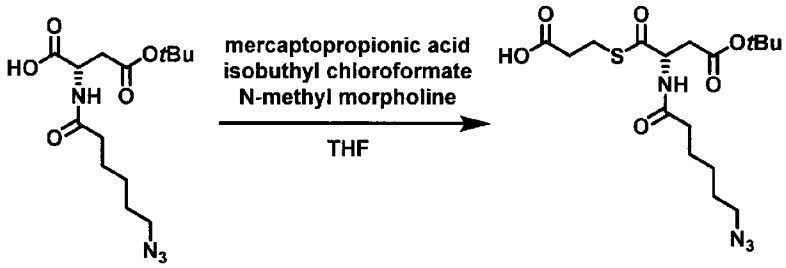
[0501] ６－アジドヘキサン酸（３００ｍｇ，１．９１ｍｍｏｌ）をＴＨＦ溶媒（２０ｍＬ）に溶解させ、０℃にてクロロ炭酸イソブチル（２８４μＬ，２．１０ｍｍｏｌ）、Ｎ－メチルモルホリン（２７３μＬ，２．４８ｍｍｏｌ）を加え３０分攪拌し、６－アジドヘキサン酸の混合酸無水物を調製した。室温にて４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－アミノ－ブタン酸（３６２ｍｇ、２．１０ｍｍｏｌ）を１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（２．１０ｍＬ）に溶解させたのち、前述の６－アジドヘキサン酸の混合酸無水物のＴＨＦ溶液を室温にて滴下した。室温にて１６時間攪拌した後、６Ｍ塩酸水溶液を加え、系内のｐＨを３．０に調整した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、

食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより粗生成物を得たのち、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、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ－ブタン酸（３５２ｍｇ，１．０７ｍｍｏｌ）を得た。

[0502] ^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，Ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ－ｄ）　δ　６．５６（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），４．７６（ｄｄｄ，Ｊ＝７．６，５．２，４．８Ｈｚ，１Ｈ），３．２２（ｔ，３．６Ｈｚ，２Ｈ），２．９０（ｄｄ，Ｊ＝１７．２，４．８Ｈｚ，１Ｈ），２．７０（ｄｄ，Ｊ＝１７．２，５．２Ｈｚ，１Ｈ），２．２２（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），１．５３－１．６５（ｍ，４Ｈ），１．３７（ｓ，９Ｈ），１．３６－１．３１（ｍ，２Ｈ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：３５１［Ｍ＋Ｎａ］$^+$

[0503] [化77]



[0504] ４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ－ブタン酸（５０．０ｍｇ，０．１５２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１．５ｍＬ）に溶解させ、０℃にてクロロ炭酸イソブチル（３０．９μＬ，０．２２８ｍｍｏｌ）、Ｎ－メチルモルホリン（２８．５μＬ，０．２５８ｍｍｏｌ）を加え３０分攪拌し、対応する混合酸無水物を調製した。室温にてメルカプトプロピオン酸（３２．３ｍｇ、０．４５６ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（ｍｌ）に溶解させたのち、前述の混合酸無水物のＴＨＦ溶液を室温にて滴

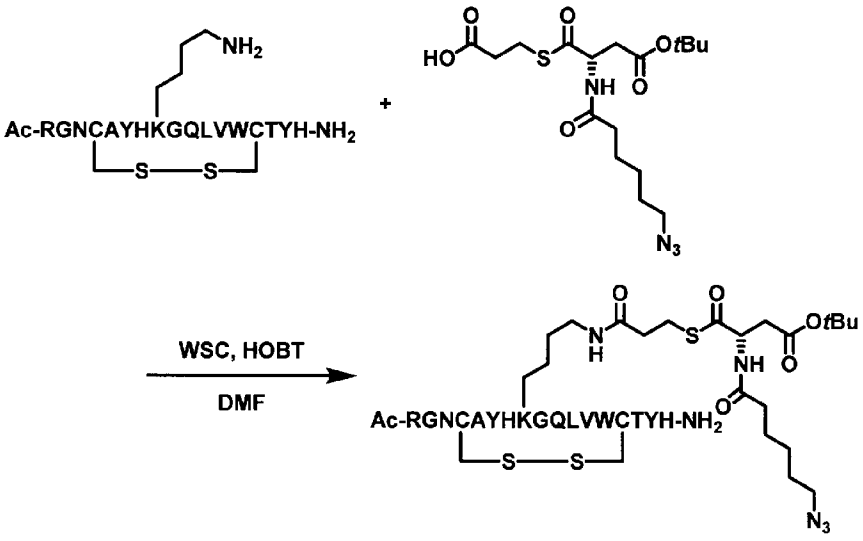
下した。室温にて１６時間攪拌した後、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加え、系内のｐＨを９．０に調整した。反応液を水と酢酸エチルで洗浄し、水相を回収した。水相に６Ｍ塩酸水溶液を加え、系内のｐＨを３．０に調整した後、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、有機相を食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、３－［４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ－１－オキソ］スルファニル－プロパン酸（６０．１ｍｇ，０．１４４ｍｍｏｌ）を得た。

[0505] ^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，Ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ－ｄ）　δ　６．６９（ｄ，Ｊ＝９．６Ｈｚ，１Ｈ），４．８９（ｄｔ，Ｊ＝９．６，４．４Ｈｚ，１Ｈ），３．２２（ｔ，８．５Ｈｚ，２Ｈ），３．０７（ｔ，７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．８２－２．６０（ｍ，３Ｈ），２．２９－２．２２（ｍ，３Ｈ），１．７０－１．５２（ｍ，４Ｈ），１．４２－１．３９（ｍ，２Ｈ），１．４０（ｓ，９Ｈ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：４３９［Ｍ＋Ｈ］$^+$

[0506] （１１－１－２）チオエステルリンカーとペプチドの連結

[化78]

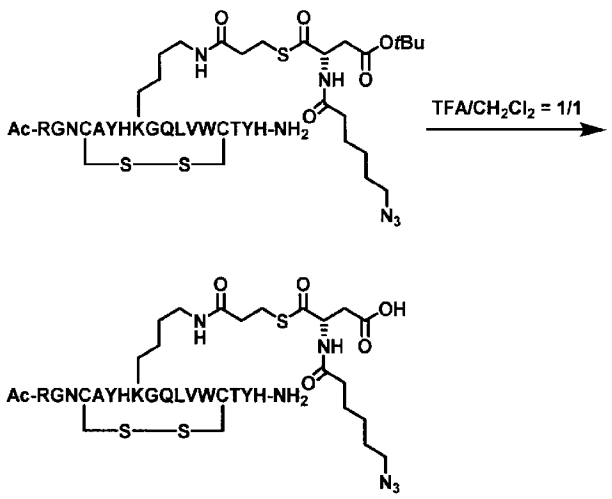


上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0507] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号３９）のペプチド（２０．０ｍｇ，９．６４μｍｏｌ、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１ｍＬに溶解し、３－［４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ－１－オキソ］－スルファニル－プロパン酸（６０．１ｍｇ，０．１４４ｍｍｏｌ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（２５．９ｍｇ，０．１３５ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１８．２ｍｇ，０．１３５ｍｍｏｌ）をＤＭＦ１ｍＬに溶解させ、系中に加えた。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－ｔＢｕ体（１５ｍｇ，７．２３μｍｏｌ）を得た。

[0508] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝２ １２３７［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３ ８２４［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0509] [化79]

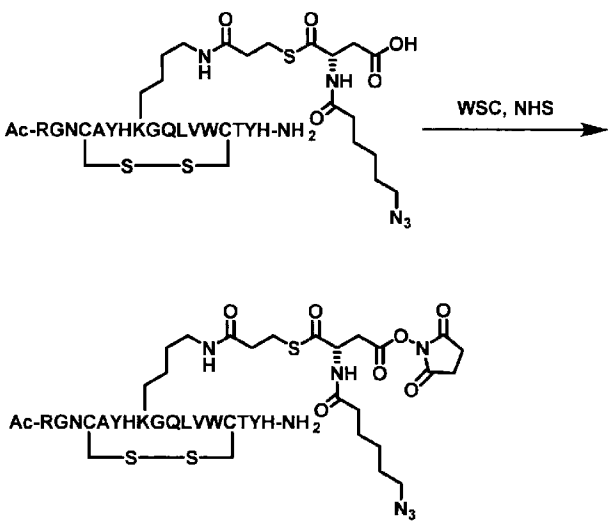


上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0510] 上記ペプチドリンカー連結物（１０．０ｍｇ，４．８２μｍｏｌ）をジクロロメタン０．２５０ｍＬ中に溶解し、トリフルオロ酢酸を０．２５０ｍＬ加え室温中で１時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、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－カルボン酸体（６．２ｍｇ，２．５７μｍｏｌ）を得た。

[0511] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝２ １２０８［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３ ８０６［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0512] [化80]



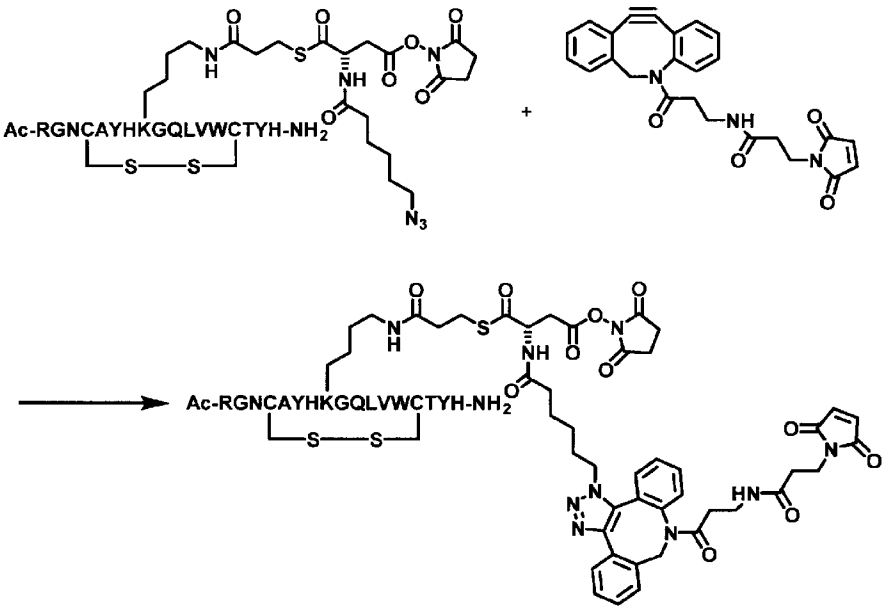
上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0513] 上記ペプチドリンカー連結物－カルボン酸体（５．７ｍｇ，２．３６μｍｏｌ）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド０．５ｍＬに溶解し、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（９．１ｍｇ，４７．２μｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（８．１ｍｇ，７０．８μｍｏｌ）を加え１６時間攪拌した。反応液に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、上記ペプチドーアジド修飾チオエステルリン

カー連結物－ＮＨＳ活性化体（３．０ｍｇ，１．１９μｍｏｌ）を得た。

[0514] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝２　１２５７［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　８３８［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0515] [化81]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

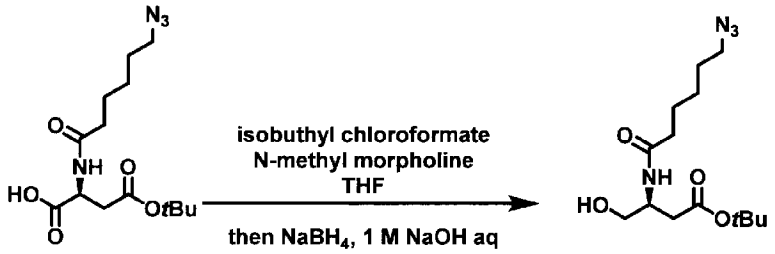
[0516] 上記ペプチド－アジド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（３．０ｍｇ，１．２０μｍｏｌ）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド０．５ｍＬに溶解し、上記ジベンゾシクロオクチン－マレイミド（０．６ｍｇ，１．２μｍｏｌ）を加え１６時間攪拌した。反応液に０．１％トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド－マレイミド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（２．８ｍｇ，０．９５μｍｏｌ）を得た。

[0517] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝２　１４７１［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　９８１［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0518] （１１－２）エステルリンカーの合成とペプチドとの連結

（１１－２－１）エステルリンカーの合成

[化82]

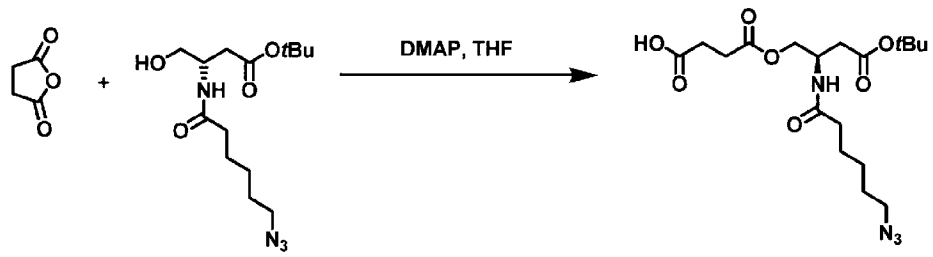


[0519] ４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－［（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ］－ブタン酸（５０ｍｇ，０．１５２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１．５ｍＬ）に溶解させ、０℃にてクロロ炭酸イソブチル（２２．７μＬ，０．１６７ｍｍｏｌ）、Ｎ－メチルモルホリン（２１．７μＬ，０．１９８ｍｍｏｌ）を加え３０分撹拌し、対応する混合酸無水物を調製した。室温にて水素化ホウ素ナトリウム（２８．７ｍｇ、０．７６ｍｍｏｌ）を１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（１．０ｍｌ）に溶解させたのち、前述の混合酸無水物のＴＨＦ溶液を室温にて滴下した。室温にて１６時間攪拌した後、系内に酢酸エチルを加え、水、食塩水で洗浄後、有機相を回収し、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより粗生成物を得たのち、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、ｔｅｒｔ－ブチル　４－ヒドロキシ－３－［（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ］－ブタノエート（３８．１ｍｇ，０．１２１ｍｍｏｌ）を得た。

[0520] ^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，Ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ－ｄ）　δ　６．３６（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），４．２０（ｍ，１Ｈ），３．６９（ｄｔ，１２．４，４．４Ｈｚ，２Ｈ），３．２７（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），２．５０（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ），２．２２（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），１．５３－１．７２（ｍ，４Ｈ），１．４１（ｓ，９Ｈ），１．４０－１．３８（ｍ，２Ｈ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：３３７［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$

[0521] [化83]

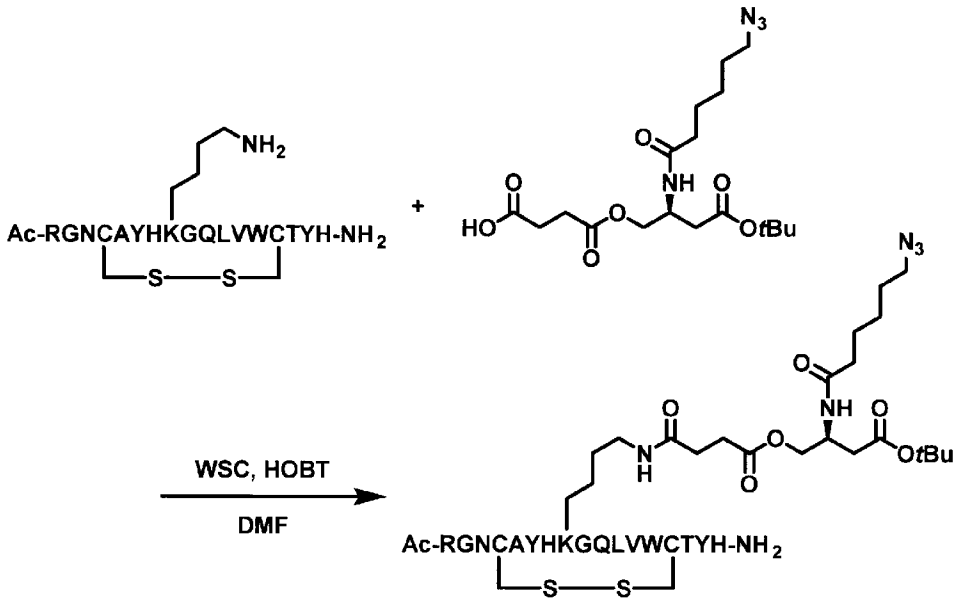


[0522] ｔｅｒｔ－ブチル－４－ヒドロキシ－３－［（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ］－ブタノエート（７０．４ｍｇ，０．２２４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（２．２ｍＬ）に溶解させ、室温にてコハク酸無水物（６７．３ｍｇ，０．６７３ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（８２．２ｍｇ，０．６７３ｍｍｏｌ）を加え、室温にて１６時間攪拌した後、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加え、系内のｐＨを９．０に調整した。反応液に水と酢酸エチルを加え分液操作をしたのち、水相を回収した。水相に６Ｍ塩酸水溶液を加え、系内のｐＨを３．０に調整した後、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、有機相を食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、４－［４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ］オキシ－４－オキソ－プロパン酸（７８．９ｍｇ，０．１９０ｍｍｏｌ）を得た。

[0523] ^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，Ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍ－ｄ）　δ　６．２８（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），４．５２（ｍ，１Ｈ），４．２９（ｄｄ，Ｊ＝１１．２，４．４，１Ｈ），４．１５（ｄｄ，Ｊ＝１１．２，５．６），３．２８（ｍ，２Ｈ），２．６６（ｍ，４Ｈ），２．４９（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ），２．１８（ｔ，Ｊ＝７．２，２Ｈ），１．７２－１．５０（ｍ，４Ｈ），１．４２（ｓ，９Ｈ），１．４１－１．３８（ｍ，２Ｈ）．
ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：４１５［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0524] （１１－２－２）エステルリンカーとペプチドの連結

[化84]



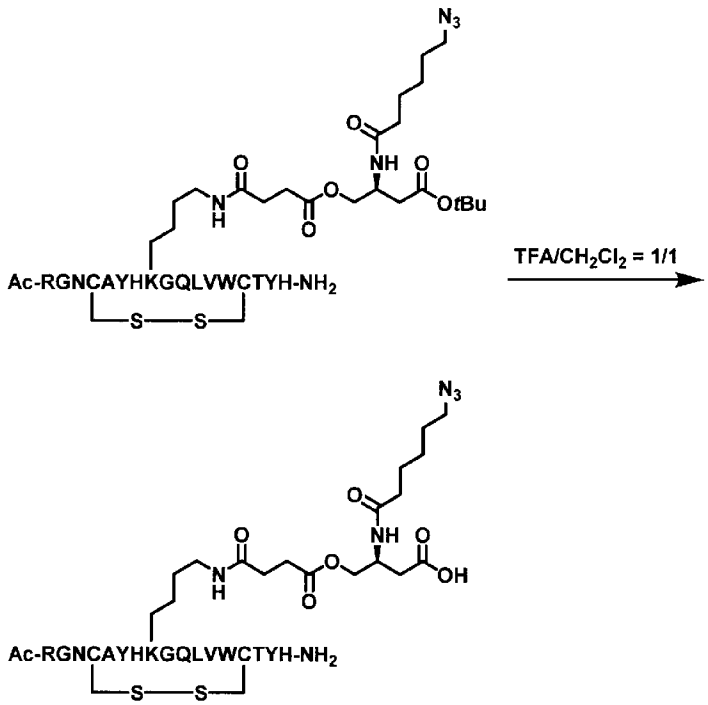
上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0525] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号３９）のペプチド（２０ｍｇ，９．６３μｍｏｌ、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１ｍＬに溶解し、（４－［４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（６－アジドヘキシ－１－オキソ）アミノ］オキシ－４－オキソ－プロパン酸（３９．９ｍｇ，９６．３μｍｏｌ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（２５．８ｍｇ，０．１３５ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１８．２ｍｇ，０．１３５ｍｍｏｌ）をＤＭＦ１ｍＬに溶解させ、系中に加えた。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－ｔＢｕ体（１８．２ｍｇ，７．３６μｍｏｌ）を得た。

[0526] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝２ １２３６［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３ ８２

４［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0527] [化85]



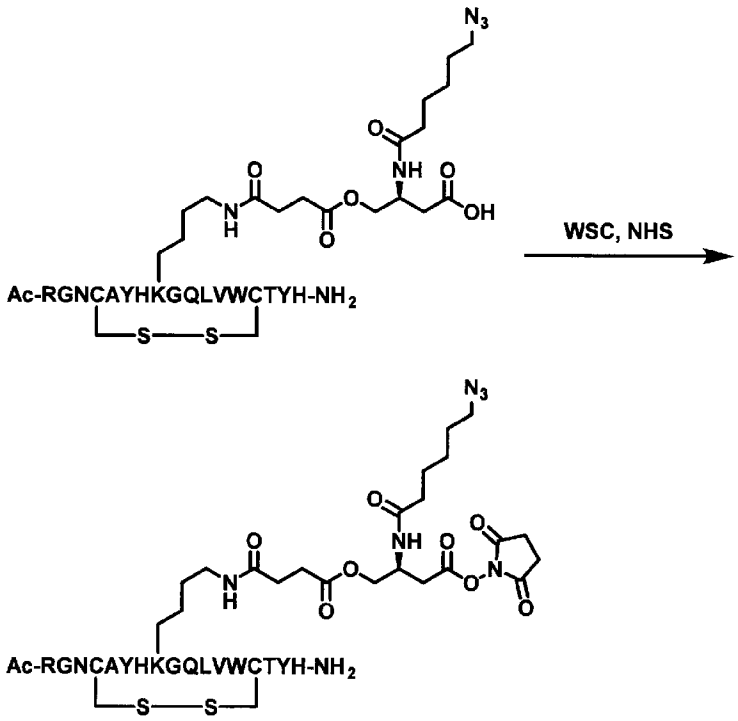
上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0528] 上記ペプチドリンカー連結物（１６．５ｍｇ，６．６７μｍｏｌ）をジクロロメタン１．０ｍＬ中に溶解し、トリフルオロ酢酸を１．０ｍＬ加え室温中で１時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、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－カルボン酸体（１５．２ｍｇ，６．２９μｍｏｌ）を得た。

[0529] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝２ １２０８［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３ ８０５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0530]

[化86]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

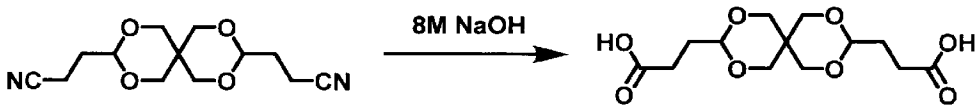
[0531] 上記ペプチドリンカー連結物－カルボン酸体（３．０ｍｇ，１．２１μｍｏｌ）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド１ｍＬに溶解し、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（４．７ｍｇ，２４．３μｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（４．２ｍｇ，３６．４μｍｏｌ）を加え１６時間攪拌した。反応液に０．１％トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド－アジド修飾エステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（３．０ｍｇ，１．１９μｍｏｌ）を得た。

[0532] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝２ １２５７［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３ ８３７［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0533] （１１－３）アセタールリンカーの合成とペプチドの連結

（１１－３－１）アセタールリンカーの合成

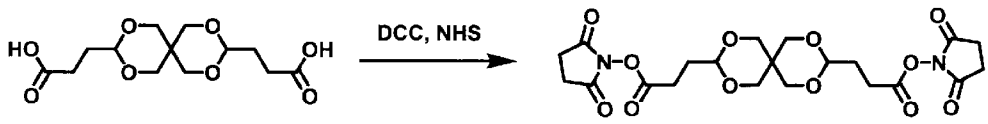
[化87]



[0534] ３，９－ビス（２－シアノエチル）－２，４，８，１０－［５．５］テトラオキサスピロウンデカン（２００ｍｇ，０．７５２ｍｍｏｌ）を８Ｍ水酸化ナトリウム水溶液２０ｍＬに溶解させ、１００℃で１６時間攪拌した。１６時間後室温に戻し、水相に６Ｍ塩酸水溶液を加え、系内のｐＨを７．０に調整した後、アセトニトリル、食塩水を順次加え分液操作を行った。アセトニトリル相を回収後、無水硫酸ナトリウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、２，４，８，１０－［５．５］テトラオキサスピロウンデカン－３，９－ジプロパン酸（１５１ｍｇ，０．４９７ｍｍｏｌ）を得た。

[0535] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：３２７［Ｍ＋Ｎａ］＋

[0536] [化88]

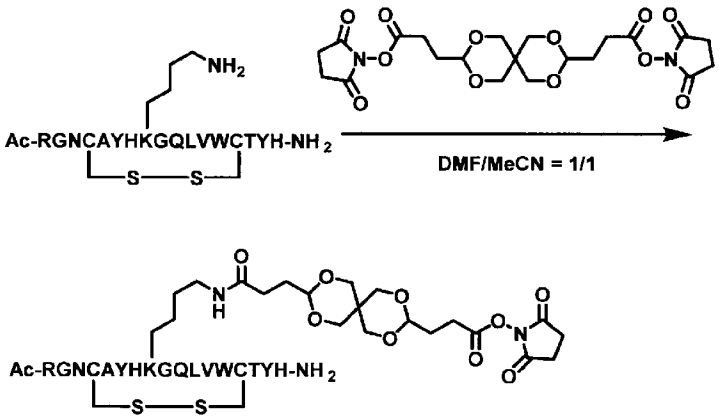


[0537] ２－［９－（２－メトキシ－２－オキソ－エチル）－２，４，８，１０－テトラオキソスピロ［５．５］ウンデカン－３－イル］酢酸（３０．０ｍｇ，０．０９９ｍｍｏｌ）を酢酸エチル０．５ｍＬに溶解し、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（２２．４ｍｇ，０．１０９ｍｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（３１．２ｍｇ，０．２７１ｍｍｏｌ）を加え２時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液を減圧下濃縮し、ビス（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）２，４，８，１０－［５．５］テトラオキサスピロウンデカン－３，９－ジプロパノエート（１５ｍｇ，３１．８μｍｏｌ）を得た。

[0538] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：５２１［Ｍ＋Ｎａ］＋

[0539] （１１－３－２）アセタールリンカーとペプチドの連結

[化89]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0540] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号３９）のペプチド（３．０ｍｇ，１．４５μｍｏｌ、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０．３ｍＬに溶解し、（ビス（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）２，４，８，１０－［５．５］テトラオキサスピロウンデカン－３，９－ジプロパノエート（１４．４ｍｇ，２８．９μｍｏｌ）を加え室温で１２時間攪拌した。水を加え中性のアセトニトリルおよび水を溶媒として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、上記ペプチドアセタールリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（２．８ｍｇ，１．１４μｍｏｌ）を得た。

[0541] ＭＳ（ＥＳＩ） ｍ／ｚ：ｚ＝２ １７２９［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３ ８１９［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0542] ［実施例１２：種々の化合物による抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾、ならびにＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析］

（１２－１）アジド修飾チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬によるＩ

ｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例１１の（１１－１－２）で合成したペプチド－アジド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）１２０μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）３９．８μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を２．４μＬ（抗体に対して１２等量）加えて、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。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、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された１５３０１８にピークが観測された。

[0543] （１２－２）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体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

（１２－１）で生成した抗体・ペプチド複合体のＰＢＳ溶液に７ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２．０μＬ（抗体に対して１００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、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された５２９９５および５３１５６にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0544] （１２－３）マレイミド修飾チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例１１の（１１－１－２）で合成したペプチド－マレイミド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）１２０μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）３９．８μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を２．４μＬ（抗体に対して１２等量）加えて、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋによ

り９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。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、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された１５３９０１にピークが観測された。

[0545] （１２－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体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

（１２－３）で生成した抗体・ペプチド複合体のＰＢＳ溶液に７ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２．０μＬ（抗体に対して１００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、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された５３４２１および５３６００にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0546] （１２－５）アジド修飾エステルリンカー結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例１１の（１１－２－２）で合成したペプチド－アジド修飾エステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）１２０μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）３９．８μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を２．４μＬ（抗体に対して１２等量）加えて、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。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、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された１５３０２８にピークが観測された。

[0547] （１２－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体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

（１２－５）で生成した抗体・ペプチド複合体のＰＢＳ溶液に７ｍＭトリ

ス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２．０μＬ（抗体に対して１００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および５０７５７に重鎖ピーク、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された５２９９４および５３１５４にピークが確認され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0548] （１２－７）アセタールリンカー結合性ペプチド試薬によるＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例１１の（１１－３－２）で合成したペプチド－アセタールリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）１２０μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）３９．８μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を２．４μＬ（抗体に対して１２等量）加えて、室温で１時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。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１４８２３８にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された１５３５２２にピークが観測された。

[0549] （１２－８）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体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

（１２－７）で生成した抗体・ペプチド複合体のＰＢＳ溶液に７ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２．０μＬ（抗体に対して１００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、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された５２９４０および５３１０３にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0550] ［実施例１３：トラスツズマブ・ペプチド複合体の切断、およびそれらの生

成物のＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析]

（１３－１）トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

先ず、実施例１２の（１２－１）で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体４０μｇを１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ・塩酸バッファー（ｐＨ８．５）に溶解し、２．０μＭとした後、室温で４８時間攪拌して、リンカー中のチオエステル結合を切断した。ＥＳＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は１５３０１８にピークが観測され、生成物はアジドが二つ導入された１４８７２９にピークが観測された。

[0551] （１３－２）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

（１３－１）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２．０μＬ（抗体に対して１００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・ペプチド複合体は５２９９５および５３１５５に重鎖ピーク、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジドが導入された５０８５０および５１０１０にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0552] （１３－３）トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

先ず、実施例１２の（１２－３）で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体２０μｇを１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ・塩酸バッファー（ｐＨ８．５）に溶解し、２．０μＭとした後、室温で４８時間攪拌して、リンカー中のチオエステル結合を切断した。ＥＳＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は１５３９０１にピークが観測され、生成物はマレイミドが二つ導入された１４９４７６にピークが観測された。

[0553] （１３－４）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

（１３－３）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２．０μＬ（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、トラスツズマブ・ペプチド複合体は５３４２１、および５３６００に重鎖ピーク、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にマレイミドが導入された５１２７８および５１４３９にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0554] （１３－５）エステルリンカーの切断とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

任意のバッファー（ｐＨ４．５～９．０）に、実施例１２の（１２－５）で合成した抗体・ペプチドエステルリンカー複合体を溶解し、エステラーゼ系酵素を加え室温で攪拌することで、エステル構造が加水分解し、アジド基が抗体上に残る。これをＥＳＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定することができる。

[0555] （１３－６）トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

先ず、実施例１２の（１２－７）で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体２０μｇを１００ｍＭ　グリシン・塩酸バッファー（ｐＨ２．０）に溶解し、２．０μＭとした後、室温で攪拌して、リンカー中のアセタール結合を切断した。ＥＳＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は１５３５２２３にピークが観測され、生成物はアルデヒドが二つ導入された１４８４５２にピークが観測された。

[0556] （１３－７）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

（１３－１）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２．０μＬ（抗体に対して１００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、原料の抗体・ペプチド複合体は５２９４０，および５３１０３に重鎖ピーク、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアルデ

ヒドが導入された５０６８３および５０８４５にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0557] ［実施例１４：トラスツズマブ－アジド導入体と低分子化合物とのコンジュゲーション］

（１４－１）トラスツズマブのアジド導入体と低分子化合物とのコンジュゲーション

実施例１３の（１３－１）で合成した、トラスツズマブのアジド導入体を２０ｍＭ　ＰＢＳバッファーに溶解し０．３ｍＭとした後、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ製　Ｄｉｂｅｎｚｏｃｙｃｌｏｏｃｔｙｎｅ－Ｃｙ３（０．９４ｍＭ、ＤＭＦに溶解）を２０μＬ添加し、室温で１２時間攪拌した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換し反応を停止した。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のアジド導入体は１４８７０６にピークが観測され、生成物は低分子が二つ導入された１５０６８８にピークが観測された。

[0558] （１４－２）トラスツズマブ－低分子化合物複合体の還元条件でのＥＳＩ－ＴＯＦＭＳ解析による重鎖選択性の確認

（１４－１）で生成した抗体・低分子複合体のＰＢＳ溶液に７ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２μＬ（抗体に対して１００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のアジド導入体は５０８５０および５１０１０に重鎖ピーク、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に低分子が導入された５１８３４および５１９９０にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0559] ［実施例１５：トラスツズマブのアジド導入体のペプチドマッピング］

（１５－１）トラスツズマブのアジド導入体（実施例１４）のトリプシン処理

１．５ｍＬ低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を１０μＬ、５

０ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液、２０％トリフルオロエタノールに溶解した２０ｍＭのジチオスレイトール水溶液１０μＬを加えて６５℃で１時間加温後、５０ｍＭのヨードアセトアミド水溶液１０μＬを添加し、遮光下室温で３０分間３００ｒｐｍで振盪し反応させた。反応後、５０ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を４０μＬ加えて撹拌し、２０ｎｇ／μＬのトリプシン水溶液（Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　Ｇｒａｄｅ，　Ｃｏｄｅ　Ｎｏ．Ｔ６５６７－５ｘ２０μｇ（ＳＩＧＭＡ））を１０μＬ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２μＬ添加し反応を止めた。その後、終濃度０．２５％トリフルオロ酢酸水溶液となるように２倍希釈し、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定に使用した。

[0560] （１５－２）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）

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）

[0561] （ＨＰＬＣ分析条件）

トラップカラム：Ａｃｃｌａｉｍ　ＰｅｐＭａｐ（登録商標）　１００，７５μｍｘ２ｃｍ（サーモフィッシャーサイエンティフィック）

分析カラム：ＥＳＩ－ｃｏｌｕｍｎ（ＮＴＣＣ－３６０／７５－３－１２５，７５μｍ×１２．５ｃｍ，３μｍ（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：３００ｎＬ／ｍｉｎ

サンプル注入量：１μＬ

グラジエント条件（Ｂ％）：２％（０．０－０．５分）、２％→３０％（０．５－２３．５分）、３０％→７５％（２３．５－２５．５分）、７５％

（２５．５－３５．０分）

[0562]（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　Ａｑｕｉｓｉｔｉｏｎ　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）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）を用いて行った。

[0563]（１５－３）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）を用いて行った。

[0564]　Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｅｒでの解析は、ＳｅｑｕｅｓｔＨＴ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３５０～５０００Ｄａ、Ｔｏｔａｌ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ　Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄを５００００とした。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（アジド導入体（＋２５４．１０２Ｄａ）、アミン導入体（＋２２８．１１１Ｄａ））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。

[0565] 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２４に示される（１）～（３）を用いた。

[0566] （１５－４）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（アジド導入体（＋２５４．１０２Ｄａ））を含むアミノ酸３３残基からなるペプチド、ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号４０）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　９７９．４９９８２、理論値：９７９．４９９７５、４価）が観測され（図２５）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４６位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ１９に相当するｍ／ｚ　１１９２．８７（理論値：１１９２．６４）のプロダクトイオンが確認された（図２６）。

[0567] ［実施例１６：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（１６－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

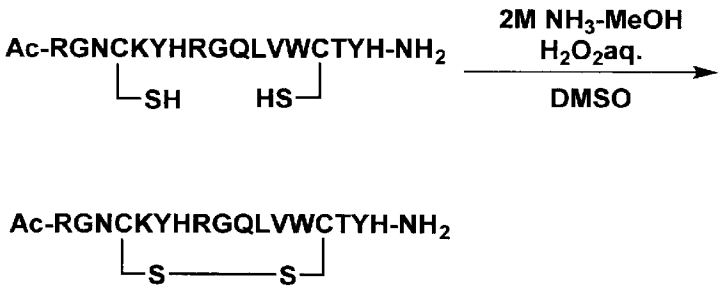
Ａｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４２）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ　ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒｅｓｉｎをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、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０．０５％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、目的物（３６．４ｍｇ，１６．８μｍｏｌ）を得た。

[0568] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７２１．８０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５４１．６０ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0569] （１６－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－$ＮＨ_2$（配列番号４２）の４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化90]



上記アミノ酸配列は、配列番号４２である。

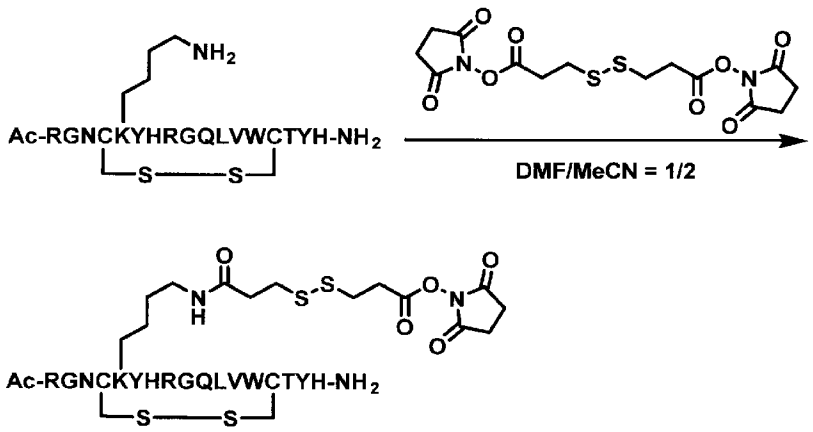
[0570] （１６－１）で合成したペプチド（３６．４ｍｇ，１６．８μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し２Ｍ $ＮＨ_3$－ＭｅＯＨ（１７．０μＬ，３３．６μｍｏｌ）、過酸化水素水（３４．０μＬ，０．３３６ｍｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌を行った。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を０．０５％含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをＬＣ－ＭＳにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減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（２０．３ｍｇ，９．４

０μｍｏｌ）を得た。

[0571] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７２１．２５ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５４１．２０ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0572] （１６－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化91]



上記アミノ酸配列は、配列番号４２である。

[0573] （１６－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４２）（２０．３ｍｇ，９．４０μｍｏｌ、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）（２２８ｍｇ，０．５６３ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（６．８０ｍｇ，２．７８μｍｏｌ）を得た。

[0574] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：　ｚ＝３　８１７．６０　［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，
ｚ＝４　６１３．４５　［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$
ＨＰＬＣ純度：１００％

[0575] （１６－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＭＡＬＤＩ－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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ由来ピークは確認されず、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が１５２６３９にピークが観測された。

[0576] （１６－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析
（１６－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0577] 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；

[0578] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ ９．４５４分はトラスツズマブ原料、９．８４５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、１０．１７３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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ ９．５４１分はトラスツズマブ原料、９．９３６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、１０．２５４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２７）。

[0579] ［実施例１７：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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

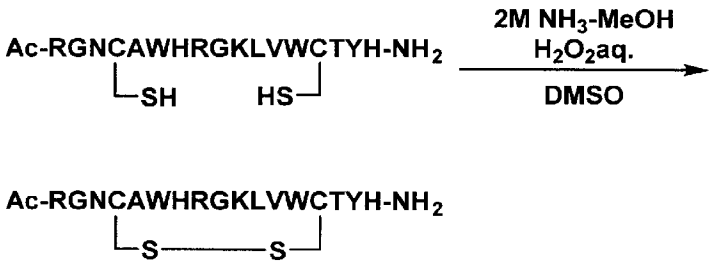
Ａｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＲＧＫＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４３）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ Ｒｅｓｉｎ ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒｅｓｉｎをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテル加えエーテル沈澱を行い、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０．０５％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、目的物（６４．８ｍｇ，３０．５μｍｏｌ）を

得た。

[0580] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：　ｚ＝３　７１０．４５　［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0581] （１７－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＲＧＫＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４３）の４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化92]



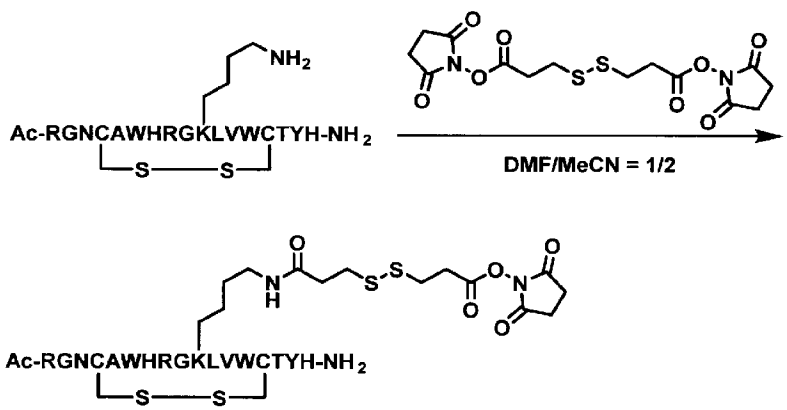
上記アミノ酸配列は、配列番号４３である。

[0582] （１７－２）で合成したペプチド（６４．８ｍｇ，３０．５μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　ＮＨ$_3$－ＭｅＯＨ（３１．０μＬ，６１．０μｍｏｌ）、過酸化水素水（６２．０μＬ，６１０μｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌した。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、目的物（３５．３ｍｇ，１６．６μｍｏｌ）を得た。

[0583] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：　ｚ＝３　７０９．７５　［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５３２．５５　［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0584] （１７－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化93]



上記アミノ酸配列は、配列番号４３である。

[0585] （１７－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＲＧＫＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４３）（３５．３ｍｇ，１６．６μｍｏｌ、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（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）（２６９ｍｇ，０．６６４ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（１７．５ｍｇ，７．２５μｍｏｌ）を得た。

[0586] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ８０６．２０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ６０４．９０ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

ＨＰＬＣ純度：１００％

[0587] （１７－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－

ＴＯＦＭＳによる解析

（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ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８２３５にピークが観測され、結合性ペプチドが導入された生成物由来のピークは観測されなかった。

[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

（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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０５９４、５０７５３および、原料と同じ２３４３５に軽鎖ピークが観測された。

[0589] （１７－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（１７－４）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Ｂｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[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] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４６９分はトラスツズマブ原料、１０．１８０分はペプチド由来のピークであると考えられる。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５６３分はトラスツズマブ原料、１０．２７０分はペプチド由来のピークであると考えられる（図２８）。

[0592] ［実施例１８：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（１８－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

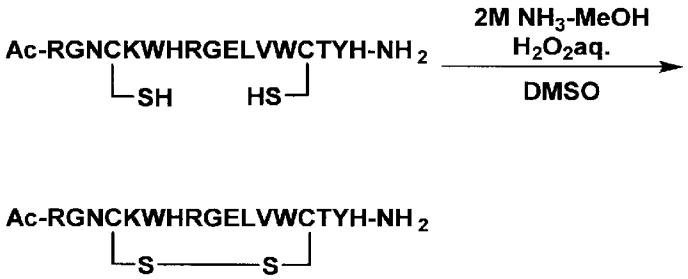
Ａｃ－ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４４）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ　ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒｅｓｉｎをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、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０．０５％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、目的物（７７．８ｍｇ，３５．６μｍｏｌ）を得た。

[0593] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７２９．７０ ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$， ｚ＝４ ５４７．６０ ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0594] （１８－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴＹＨ－$ＮＨ_{2}$（配列番号４４）の４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化94]



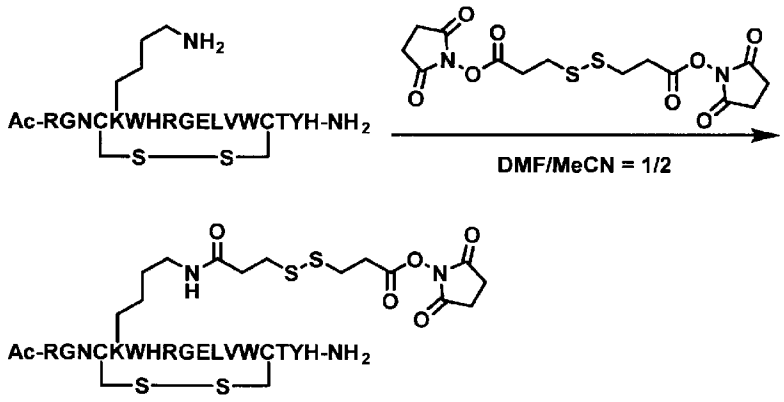
上記アミノ酸配列は、配列番号４４である。

[0595] （１８－１）で合成したペプチド（７７．８ｍｇ，３５．６μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ $ＮＨ_{3}$－ＭｅＯＨ（７１．０μＬ，１４２μｍｏｌ）、過酸化水素水（１４５μＬ，１．４２ｍｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌した。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、目的物（４０．０ｍｇ，１８．３μｍｏｌ）を得た。

[0596] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７２９．００ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５４７．０５ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0597] （１８－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化95]



上記アミノ酸配列は、配列番号４４である。

[0598] （１８－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４４）（４０．０ｍｇ，１８．３μｍｏｌ、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）（２９６ｍｇ，０．７３３ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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媒で溶出し、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（２０．０ｍｇ，８．０９μｍｏｌ）を得た。

[0599] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ８２５．５５ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ６１９．４５ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

ＨＰＬＣ純度：３１％

[0600] （１８－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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ＨＥＲ２ＩｇＧ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１５０５８３にピークが観測された。

[0601] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８０、５０７１９および、原料と同じ２３４３８に軽鎖ピークが観測された。

[0602] （１８－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（１８－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0603] 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；

[0604] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４６２分はトラスツズマブ原料、１０．１４２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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５５４分はトラスツズマブ原料、１０．２３０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２９）。

[0605] ［実施例１９：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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

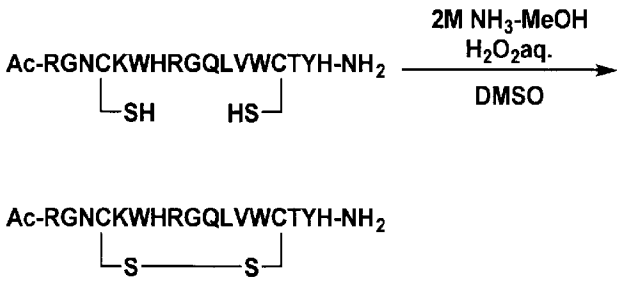
Ａｃ－ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４５）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ　ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒｅｓｉｎをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、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０．０５％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、目的物（７４．１ｍｇ，３４．０μｍｏｌ）を得た。

[0606] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７２９．４０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５４７．３５ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0607] （１９－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４５）の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]



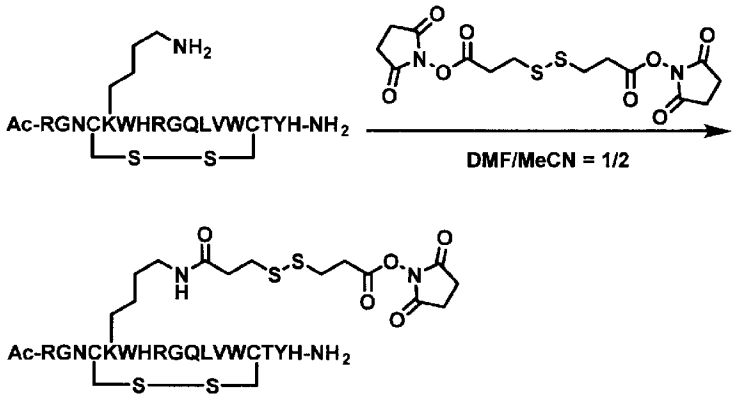
上記アミノ酸配列は、配列番号４５である。

[0608] （１９－２）で合成したペプチド（７４．１ｍｇ，３４．０μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ ＮＨ$_3$－ＭｅＯＨ（６７．８μＬ，０．１３６ｍｍｏｌ）、過酸化水素水（１３９μＬ，１．３６ｍｍｏｌ）を加えて室温で２０時間攪拌した。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、目的物（３８．２ｍｇ，１７．５μｍｏｌ）を得た。

[0609] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７２８．８０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５４６．８５ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0610] （１９－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化97]



上記アミノ酸配列は、配列番号４５である。

[0611] （１９－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４５）（３８．２ｍｇ，１７．５μｍｏｌ、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）（２８３ｍｇ，０．７０ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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、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（１６．５ｍｇ，６．６８μｍｏｌ）を得た。

[0612] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ８２５．２５ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ６１９．２５ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

ＨＰＬＣ純度：１００％

[0613] （１９－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８０６４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１５０６００にピークが観測された。

[0614] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８３、５０７１７および、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0615] （１９－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（１９－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0616] 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；

[0617] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４５８分はトラスツズマブ原料、１０．１３７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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５５０分はトラスツズマブ原料、１０．２２５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３０）。

[0618] ［実施例２０：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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

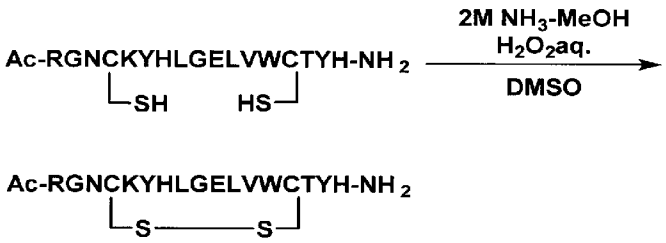
Ａｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４６）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ　ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒｅｓｉｎをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、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０．０５％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、目的物（３４．５ｍｇ，１６．３μｍｏｌ）を得た。

[0619] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７０７．８０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５３１．１０ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0620] （２０－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４６）の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]



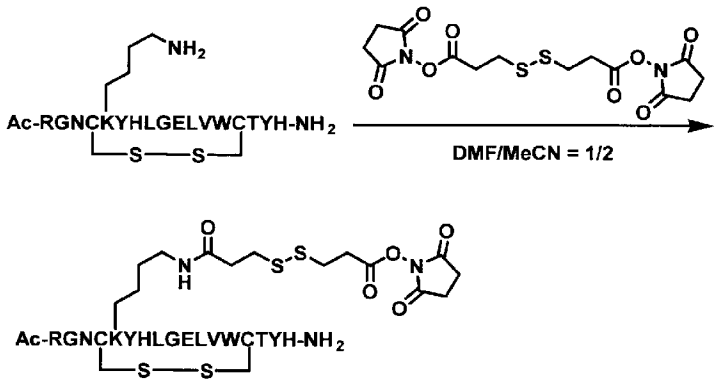
上記アミノ酸配列は、配列番号４６である。

[0621] （２０－１）で合成したペプチド（３４．５ｍｇ，１６．３μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ NH_3－ＭｅＯＨ（１７．０μＬ，３２．６μｍｏｌ）、過酸化水素水（３３．０μＬ，０．３２６ｍｍｏｌ）を加えて室温で２０時間攪拌した。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、目的物（１５．６ｍｇ，７．３７μｍｏｌ）を得た。

[0622] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝３ ７０７．１０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５３０．６０ ［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0623] （２０－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化99]



上記アミノ酸配列は、配列番号４６である。

[0624] （２０－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４６）（１５．６ｍｇ，７．３７μｍｏｌ、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）（１１９ｍｇ，０．２９５ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（５．００ｍｇ，２．０８μｍｏｌ）を得た。

[0625] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝２ １２０４．８５ ［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，
ｚ＝３ ８０３．５０ ［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$
ＨＰＬＣ純度：７０％

[0626] （２０－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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。

[0627] （２０－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２０－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0628] 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；

[0629] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５８１分にトラスツズマブ原料のピーク、１０．０８９分にピークが観測された。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．６６３分にトラスツズマブ原料のピーク、１０．３０７分にピークが観測された（図３１）。

[0630] ［実施例２１：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

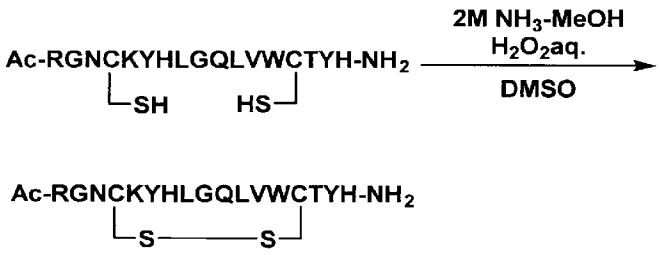
（２１－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４７）の配列を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。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。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澱を行い、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０．０５％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、目的物（５３．０ｍｇ，２５．０μｍｏｌ）を得た。

[0631] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：　ｚ＝３　７０７．４０　$[M+3H]^{3+}$，ｚ＝４　５３０．８０　$[M+4H]^{4+}$

[0632] （２１－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－NH_2（配列番号４７）の４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化100]



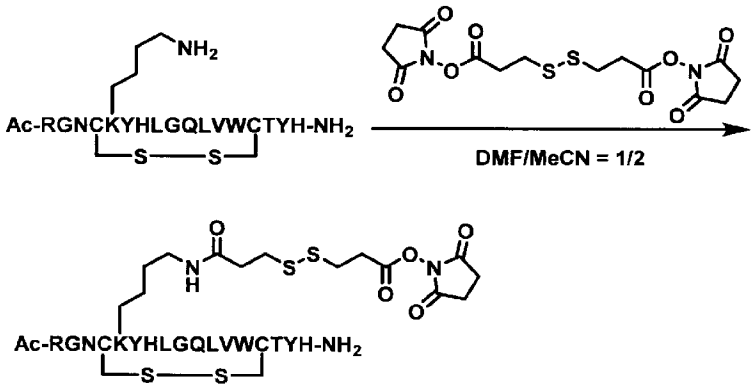
上記アミノ酸配列は、配列番号４７である。

[0633] （２１－１）で合成したペプチド（５３．０ｍｇ，２５．０μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（２５．０μＬ，５０．０μｍｏｌ）、過酸化水素水（５１．０μＬ，０．５００ｍｍｏｌ）を加えて室温で２０時間攪拌した。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、目的物（２３．２ｍｇ，１０．９μｍｏｌ）を得た。

[0634] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：　ｚ＝３　７０６．７５　$[M+3H]^{3+}$，ｚ＝４　５３０．３５　$[M+4H]^{4+}$

[0635] （２１－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化101]



上記アミノ酸配列は、配列番号４７である。

[0636] （２１－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号４７）（２３．２ｍｇ，１０．９μｍｏｌ、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（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）（１７６ｍｇ，０．４３６ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（６．４０ｍｇ，２．６６　μｍｏｌ）を得た。

[0637] ＭＳ　（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：　ｚ＝２　１２０４．３０　［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，
ｚ＝３　８０３．１５　［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$
ＨＰＬＣ純度：６１％

[0638] （２１－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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ＨＥＲ２ＩｇＧ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は１５０５１５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は１５２９７２にピークが観測された。

[0639] （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、生成物は重鎖にチオプロピオ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。

[0640] （２１－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２１－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0641] 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；

[0642] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４５４分はトラスツズマブ原料、９．８７７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、１０．２３０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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５４０分はトラスツズマブ原料、９．９６６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、１０．３１７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）。

[0643] ［実施例２２：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（２２－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＤＣＫＷＨＬＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号４８）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（７１．１ｍｇ，４３．６μｍｏｌ）を得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８１６．３５０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

[0644] （２２－２）Ａｃ－ＤＣＫＷＨＬＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号４８）の２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化102]



上記アミノ酸配列は、配列番号４８である。

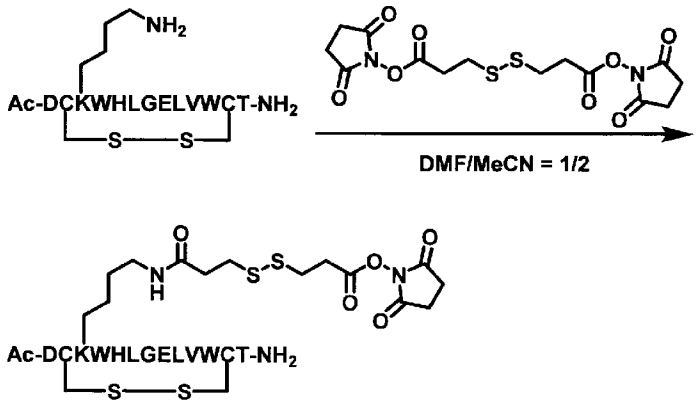
[0645] （２２－１）で合成したペプチド（７１．１ｍｇ，４３．６μｍｏｌ）を

ＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（４３．６μＬ，８７．２μｍｏｌ）、過酸化水素水（８８．８μＬ，８７．２μｍｏｌ）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（３１．６ｍｇ，１９．４μｍｏｌ）を得た。

[0646] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８１５．３５０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

[0647] （２２－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化103]



上記アミノ酸配列は、配列番号４８である。

[0648] （２２－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＷＨＬＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号４８）（３１．６ｍｇ，１９．４μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（３１２ｍｇ，７７６μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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０．０５％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（１４．２ｍｇ，７．４０μｍｏｌ）を得た。

[0649] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９６０．０５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

ＨＰＬＣ純度：７０％

[0650] （２２－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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。

[0651] （２２－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２２－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８

０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0652] 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；

[0653] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１１．１９３分、１１．９８１分にピークが観測された。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１１．２５７分、１２．０５７分にピークが観測された（図３３）。

[0654] ［実施例２３：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＤＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号４９）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（２８．０ｍｇ，１７．４μｍｏｌ）を得た。

[0655] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８０４．８０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

[0656] （２３－２）Ａｃ－ＤＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号４９）の２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化104]



上記アミノ酸配列は、配列番号４９である。

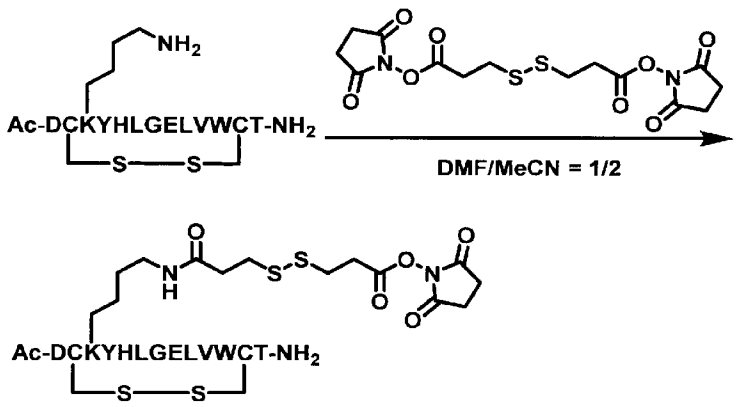
[0657] （２３－１）で合成したペプチド（２８．０ｍｇ，１７．４μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（１７．４μＬ，３４．８μｍｏｌ）、過酸化水素水（３５．４μＬ，３４８μｍｏｌ）を

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（１８．０ｍｇ，１１．２μｍｏｌ）を得た。

[0658] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８０３．９０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

[0659] （２３－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化105]



上記アミノ酸配列は、配列番号４９である。

[0660] （２３－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴ－ＮＨ$_2$（配列番号４９）（１８．０ｍｇ，１１．２μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（１８１ｍｇ，４４８μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（２．７５ｍｇ，１．４５μｍｏｌ）を得た。

[0661] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９４８．５５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

ＨＰＬＣ純度：７５％

[0662] （２３－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は１５０００１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は１５１６１８にピークが観測された。

[0663] （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、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。

[0664] （２３－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２３－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0665] 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；

[0666] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．３４７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、１１．０１５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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．４３４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、１１．１００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）。

[0667] ［実施例２４：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＤＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５０）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（５２．８ｍｇ，３１．５μｍｏｌ）を得た。

[0668] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８３７．８５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５８．９０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0669] （２４－２）Ａｃ－ＤＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５０）の２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化106]



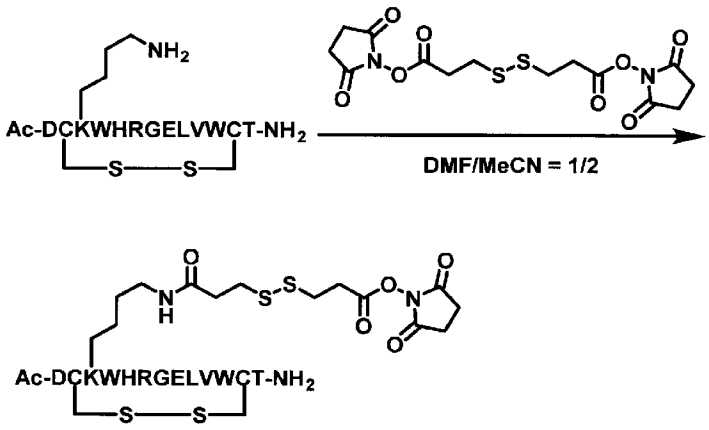
上記アミノ酸配列は、配列番号５０である。

[0670] （２４－１）で合成したペプチド（５２．８ｍｇ，３１．５μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ NH_3－ＭｅＯＨ（３１．５μＬ，６３．０μｍｏｌ）、過酸化水素水（６４．０μＬ，６３０μｍｏｌ）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（２６．９ｍｇ，１６．１μｍｏｌ）を得た。

[0671] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８３６．７５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５８．２５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0672] （２４－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化107]



上記アミノ酸配列は、配列番号５０である。

[0673] （２４－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴ－ＮＨ$_2$（配列番号５０）（２６．９ｍｇ，１６．１μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（２６０ｍｇ，６４４μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（８．４０ｍｇ，４．２８μｍｏｌ）を得た。

[0674] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９８１．５０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　６５４．７０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

ＨＰＬＣ純度：７８％

[0675] （２４－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－

ＴＯＦＭＳによる解析

（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ＨＥＲ２ＩｇＧ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、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は１５０２６８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は１５２２９５にピークが観測された。

[0676] （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

（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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８２、５０８４１および、原料と同じ２３４３８に軽鎖ピークが観測された。

[0677] （２４－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２４－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0678] 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；

[0679] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．７４９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、１１．６７９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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．８４９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、１１．７８２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３５）。

[0680] ［実施例２５：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＤＣＫＷＨＬＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５１）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（６８．５ｍｇ，４２．０μｍｏｌ）を得た。

[0681] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８１５．９０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５４４．２５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0682] （２５－２）Ａｃ－ＤＣＫＷＨＬＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５１）の２位と１２位のＣｙｓ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５１である。

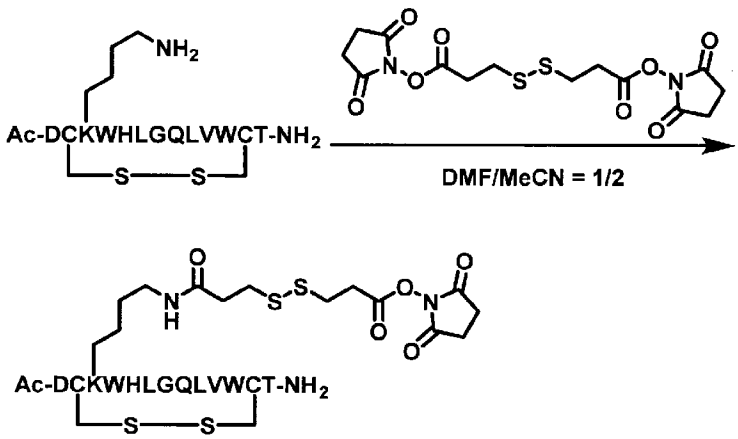
[0683] （２５－１）で合成したペプチド（６８．５ｍｇ，４２．０μｍｏｌ）を

ＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（４２．０μＬ，８４．０μｍｏｌ）、過酸化水素水（８５．７μＬ，８４０μｍｏｌ）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（３０．６ｍｇ，１８．８μｍｏｌ）を得た。

[0684] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８１４．９０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

[0685] （２５－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化109]



上記アミノ酸配列は、配列番号５１である。

[0686] （２５－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＷＨＬＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５１）（３０．６ｍｇ，１８．８μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（３０４ｍｇ，７５２μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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０．０５％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（４．１０ｍｇ，２．１４μｍｏｌ）を得た。

[0687] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９５９．４５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

ＨＰＬＣ純度：７４％

[0688] （２５－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は１５００２５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は１５１８７８にピークが観測された。

[0689] （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、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。

[0690] （２５－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２５－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0691] 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；

[0692] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．７６１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、１１．７２２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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．８４９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、１１．８０７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３６）。

[0693] ［実施例２６：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＤＣＫＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５２）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（１００ｍｇ，６

０．８μｍｏｌ）を得た。

[0694] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８２６．３５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５１．２５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0695] （２６－２）Ａｃ－ＤＣＫＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５２）の２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化110]



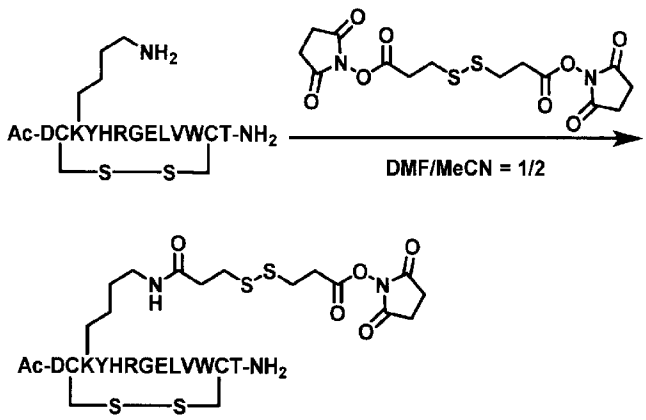
上記アミノ酸配列は、配列番号５２である。

[0696] （２６－１）で合成したペプチド（１００ｍｇ，６０．８μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（６０．８μＬ，１２２μｍｏｌ）、過酸化水素水（１２５μＬ，１．２２ｍｍｏｌ）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（７４．５ｍｇ，４５．２μｍｏｌ）を得た。

[0697] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８２５．３０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５０．６０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0698] （２６－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化111]



上記アミノ酸配列は、配列番号５２である。

[0699] （２６－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ－ＮＨ$_2$（配列番号５２）（７４．５ｍｇ，４５．２μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（７３１ｍｇ，１．８１ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（２３．０ｍｇ，１８．９μｍｏｌ）を得た。

[0700] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９７０．００［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$
ＨＰＬＣ純度：６９％

[0701] （２６－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４７０７４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は１５００６２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は１５１８７３にピークが観測された。１５４５６２に副生成物によるピークが観測された。

[0702] （２６－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２６－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0703] 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；

[0704] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４６４分はトラスツズマブ原料、１０．３０９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、１０．９６２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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５６４分はトラスツズマブ原料、１０．３９５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、１１．０５４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３７）。

[0705] 実施例２７：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

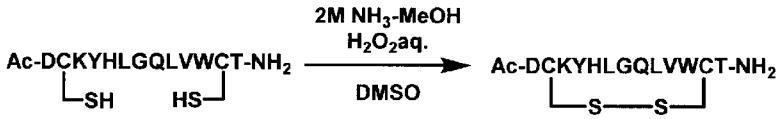
（２７－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＤＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５３）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（８５．６ｍｇ，５３．３μｍｏｌ）を得た。

[0706] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８０４．４５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５３６．６０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0707] （２７－２）Ａｃ－ＤＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５３）の２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化112]



上記アミノ酸配列は、配列番号５３である。

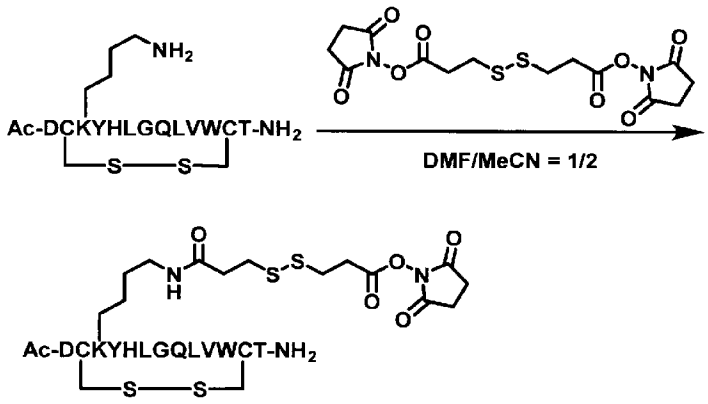
[0708] （２７－１）で合成したペプチド（８５．６ｍｇ，５３．３μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（５３．５μＬ，１０７μｍｏｌ）、過酸化水素水（１０９μＬ，１．０７ｍｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌を行った。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を０．０５％含有する水とアセトニト

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（３４．２ｍｇ，２１．３μｍｏｌ）を得た。

[0709] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８０３．４０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

[0710] （２７－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化113]



上記アミノ酸配列は、配列番号５３である。

[0711] （２７－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴ－ＮＨ$_2$（配列番号５３）（３４．２ｍｇ，２１．３μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（３４５ｍｇ，８５２μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（１２．０ｍｇ，６．３４μｍｏｌ）を得た。

[0712] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９４８．００［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

ＨＰＬＣ純度：８０％

[0713] （２７－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４７２８５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は１５００３１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は１５１９４７にピークが観測された。１５４８８５に副生成物によるピークが観測された。

[0714] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８５、５０８４７にピークが観測された。

[0715] （２７－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２７－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６

ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２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] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４６８分はトラスツズマブ原料、１０．３６０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、１１．０４５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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５７５分はトラスツズマブ原料、１０．４４９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、１１．１３７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）。

[0718] ［実施例２８：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＤＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５４）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（８９．４ｍｇ，５７．４μｍｏｌ）を得た。

[0719] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８３７．３０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５８．６０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0720] （２８－２）Ａｃ－ＤＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５４）の

２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化114]



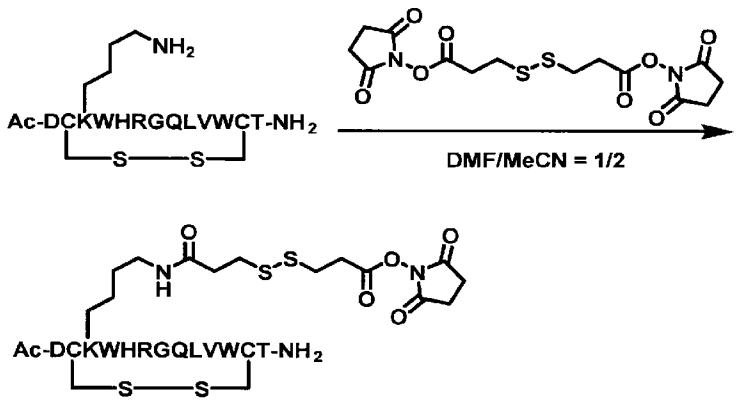
上記アミノ酸配列は、配列番号５４である。

[0721] （２８－１）で合成したペプチド（８９．４ｍｇ，５７．４μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（５３．５μＬ，１０７μｍｏｌ）、過酸化水素水（１０９μＬ，１．０７ｍｍｏｌ）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（６４．４ｍｇ，３８．５μｍｏｌ）を得た。

[0722] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８３６．３５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５８．００［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0723] （２８－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化115]



上記アミノ酸配列は、配列番号５４である。

[0724] （２８－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＷＨＲＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５４）（６４．４ｍｇ，３８．５μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（６２３ｍｇ，１．５４ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（２１．８ｍｇ，１１．１μｍｏｌ）を得た。

[0725] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９８１．０５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　６５４．２５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

ＨＰＬＣ純度：８２％

[0726] （２８－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４７５４８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は１５０２６１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は１５２１１２にピークが観測された。１５４８２４に副生成物によるピークが観測された。

[0727] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８４、５０８４５にピークが観測された。

[0728] （２８－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２８－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0729] 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；

[0730] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．４７７分はトラスツズマブ原料、１０．７１４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、１１．６５０分は副生成物であると考えられる。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５７３分はトラスツズ

マブ原料、１０．８１２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、１１．７４２分は副生成物であると考えられる（図３９）。

[0731] ［実施例２９：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

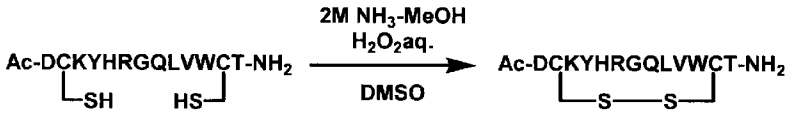
（２９－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＤＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５５）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（９３．６ｍｇ，５６．７μｍｏｌ）を得た。

[0732] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８２５．８０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５０．９０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0733] （２９－２）Ａｃ－ＤＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴ－NH_2（配列番号５５）の２位と１２位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化116]



上記アミノ酸配列は、配列番号５５である。

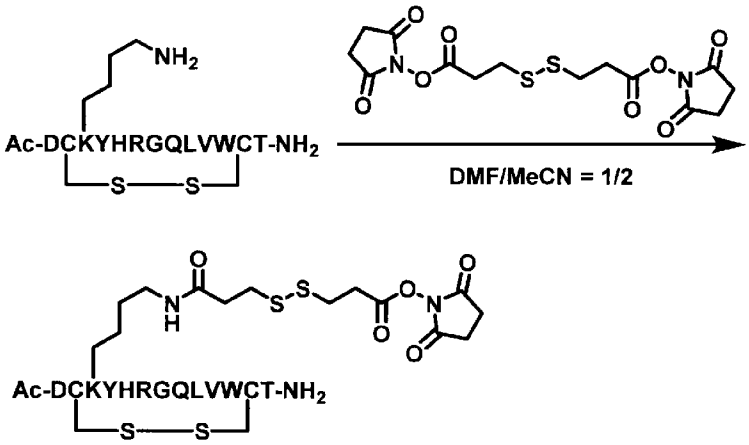
[0734] （２９－１）で合成したペプチド（９３．６ｍｇ，５６．７μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（５６．５μＬ，１１３μｍｏｌ）、過酸化水素水（１１５μＬ，１．１３ｍｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌を行った。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を０．０５％含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをＬＣ－ＭＳにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧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（７１．６ｍｇ，４６．２μｍｏｌ）を得た。

[0735] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　８２４．８５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　５５０．２５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0736] （２９－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化117]



上記アミノ酸配列は、配列番号５５である。

[0737] （２９－２）で合成したＡｃ－ＤＣＫＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴ－ＮＨ$_2$（配列番号５５）（７１．６ｍｇ，４６．２μｍｏｌ、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（１．００ｍＬ）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）（７４７ｍｇ，１．８５ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（２５．５ｍｇ，１３．２μｍｏｌ）を得た。

[0738] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　９６９．４５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　６４６．７５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

ＨＰＬＣ純度：８２％

[0739] （２９－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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ＨＥＲ２ＩｇＧ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、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は１４９８８４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は１５１８７３にピークが観測された。

[0740] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８２、５０８４４にピークが観測された。

[0741] （２９－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（２９－４）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をＨＩＣ－ＨＰＬＣにより解析した。カラムはＢｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　Ｐｉ

Ｎａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ ０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0742] 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；

[0743] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ １０．２９２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、１０．９４９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。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ １０．３８１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、１１．０３８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４０）。

[0744] ［実施例３０：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＱＬＶＷＣＫＹＨ－NH_2（配列番号５６）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（５４．２ｍｇ，２５．７μｍｏｌ）を得た。

[0745] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３ ７０５．０５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４ ５２９．１０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0746] （３０－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＱＬＶＷＣＫＹＨ－NH_2（配列番号５６）の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]



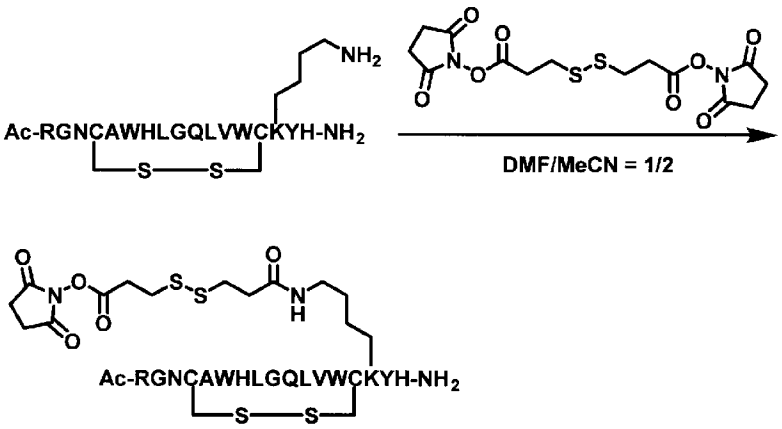
上記アミノ酸配列は、配列番号５６である。

[0747] （３０－１）で合成したペプチド（５４．２ｍｇ，２５．７μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（２５．７μＬ，５１．４μｍｏｌ）、過酸化水素水（５２．５μＬ，５１４μｍｏｌ）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（１３．３ｍｇ，５．５４μｍｏｌ）を得た。

[0748] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　７０４．４５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５２８．６０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0749] （３０－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化119]



上記アミノ酸配列は、配列番号５６である。

[0750] （３０－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＱＬＶＷＣＫＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号５６）（１３．３ｍｇ，５．５４μｍｏｌ、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）（８９．６ｍｇ，２２２μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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，２．９２μｍｏｌ）を得た。

[0751] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　８００．９０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，　ｚ＝４　６００．８０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

ＨＰＬＣ純度：６９％

[0752] （３０－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８７８８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１５１３７５にピークが観測された。

[0753] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０５９３、５０７５６および、原料と同じ２３３３７に軽鎖ピークが観測された。

[0754] （３０－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析

（３０－４）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Ｂｕｔｙｌ－ＮＰＲ（ＴＯＳＯＨ）４．６ｘ３５０ｍｍ　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は１．０ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＢ　０→１００％，１２ｍｉｎ（データ採取２０ｍｉｎ）、カラム温度は２５℃、サーモスタット温度はＲＴ、検出器はＵＶ２２５ｎｍ（Ｃｈ１）、２８０ｎｍ（Ｃｈ２）の２波長で検出した。

[0755] 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；

[0756] ＵＶ２２５ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５５６分はトラスツズマブ原料、１０．２５９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由来のピークであると考えられる。ＵＶ２８０ｎｍの場合、Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５４９分はトラスツズマブ原料、１０．３８２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由来のピークであると考えられる（図４１）。

[0757] ［実施例３１：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（３１－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＥＬＶＷＣＫＹＨ－NH_2（配列番号５７）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（３４．０ｍｇ，１６．１μｍｏｌ）を得た。

[0758] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　７０５．４０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５２９．３０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0759] （３１－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＥＬＶＷＣＫＹＨ－NH_2（配列番号５７）の４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化120]



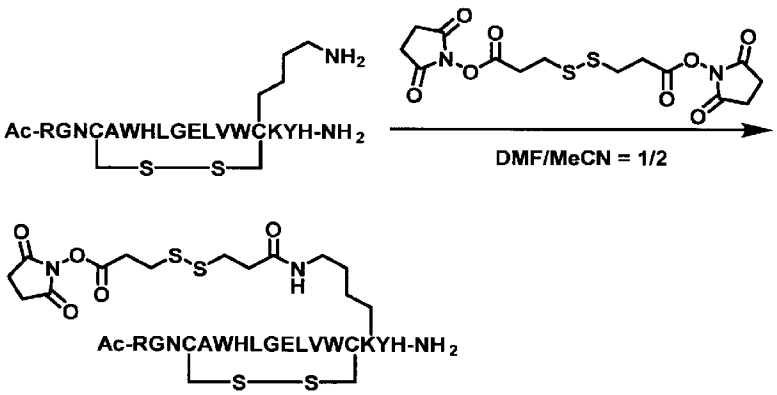
上記アミノ酸配列は、配列番号５７である。

[0760] （３１－１）で合成したペプチド（３４．０ｍｇ，１６．１μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（１６．１μＬ，３２．２μｍｏｌ）、過酸化水素水（３２．９μＬ，３２２μｍｏｌ）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（１３．６ｍｇ，６．４０μｍｏｌ）を得た。

[0761] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　７０４．８５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５２８．８０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0762] （３１－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化121]



上記アミノ酸配列は、配列番号５７である。

[0763] （３１－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＷＨＬＧＥＬＶＷＣＫＹＨ－ＮＨ$_2$（配列番号５７）（１３．６ｍｇ，６．４０μｍｏｌ、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）（１０４ｍｇ，２５６μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（１．５ｍｇ，０．６３μｍｏｌ）を得た。

[0764] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　８０１．４５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　６０１．５０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

ＨＰＬＣ純度：７７％

[0765] （３１－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

（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ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８２１９にピークが観測され、結合性ペプチドが導入された生成物由来のピークは観測されなかった。

[0766] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０５９２、５０７６２および、原料と同じ２３３３８に軽鎖ピークが観測された。

[0767] （３１－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３１－４）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_4）$_2SO_4$，ｐＨ７．０、Ｂ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，ｐＨ７．０にて流速は０．６ｍｌ／ｍｉｎ、グラジエントをＡ５０％　Ｂ５０％→Ａ０％　Ｂ１００％，１２ｍｉｎ（データ採取１５ｍｉｎ）、カラム温度は室温、サーモスタッ

ト温度は室温、検出器は２８０ｎｍの波長で検出した。

[0768] 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；

[0769] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　６．８５９０分はトラスツズマブ原料、８．０６５５分はペプチド由来のピークであると考えられる（図４２）。

[0770] ［実施例３２：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＫＨ－NH_2（配列番号５８）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（３６．７ｍｇ，１８．１μｍｏｌ）を得た。

[0771] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　６７６．７５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５０７．８０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0772] （３２－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＫＨ－NH_2（配列番号５８）の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]



上記アミノ酸配列は、配列番号５８である。

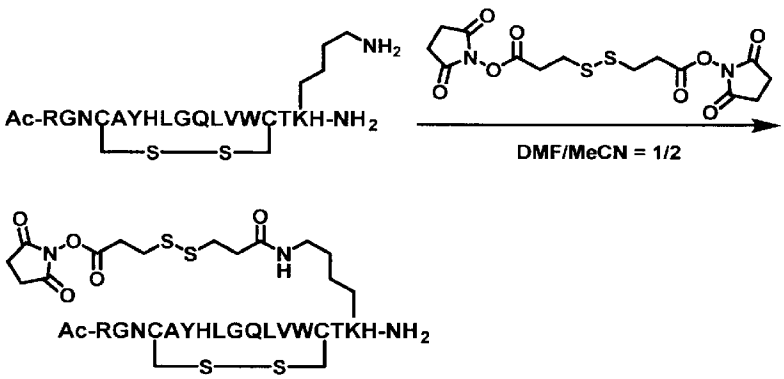
[0773] （３２－１）で合成したペプチド（３６．７ｍｇ，１８．１μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（１８．１μＬ，３６．２μｍｏｌ）、過酸化水素水（３７．０μＬ，３６２μｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌を行った。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液

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（１８．２ｍｇ，８．９９μｍｏｌ）を得た。

[0774] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　６７６．００［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５０７．３０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0775] （３２－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化123]



上記アミノ酸配列は、配列番号５８である。

[0776] （３２－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＫＨ－ＮＨ$_2$（配列番号５８）（１８．２ｍｇ，８．９９μｍｏｌ、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）（１４５ｍｇ，３６０μｍｏｌ）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（３．００ｍｇ，１．３０μｍｏｌ）を得た。

[0777] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　７７２．４５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

ＨＰＬＣ純度：９０％

[0778] （３２－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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－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ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８０７７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１５０２８１にピークが観測された。

[0779] （３２－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３２－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0780] 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；

[0781] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１１．１８００分はトラスツズマブ原料、１１．８６８２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４３）。

[0782] ［実施例３３：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＫ－NH_2（配列番号５９）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（５２．１ｍｇ，２５．４μｍｏｌ）を得た。

[0783] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　１０２７．３［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　６８５．４５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0784] （３３－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＫ－NH_2（配列番号５９）の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]



上記アミノ酸配列は、配列番号５９である。

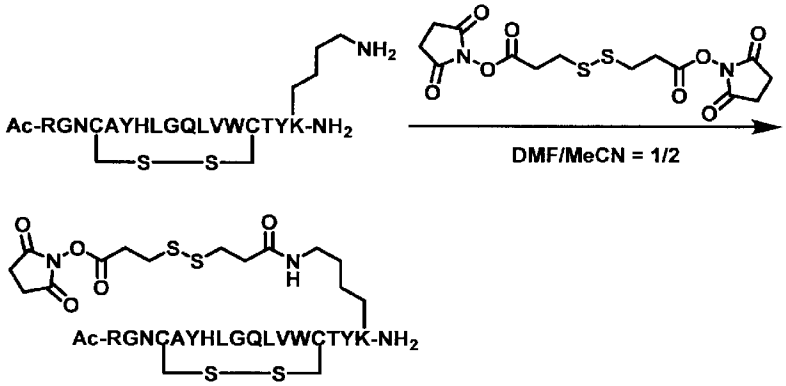
[0785] （３３－１）で合成したペプチド（５２．１ｍｇ，２５．４μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（２５．４μＬ，５０．８μｍｏｌ）、過酸化水素水（５１．９μＬ，５０８μｍｏｌ）を

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（４．７０ｍｇ，２．２９μｍｏｌ）を得た。

[0786] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝２　１０２６．５［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，　ｚ＝３　６８４．７５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0787] （３３－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化125]



上記アミノ酸配列は、配列番号５９である。

[0788] （３３－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＬＧＱＬＶＷＣＴＹＫ－ＮＨ$_2$（配列番号５９）（４．７０ｍｇ，２．２９μｍｏｌ、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）（３７．０ｍｇ，９１．６μｍｏｌ）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（５．００ｍｇ，２．１４μｍｏｌ）を得た。

[0789] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　７８１．２０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

ＨＰＬＣ純度：７９％

[0790] （３３－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８２２３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１５０４８８にピークが観測された。

[0791] （３３－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３３－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0792] 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；

[0793] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１１．１８６７分はトラスツズマブ原料、１２．２５５０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４４）。

[0794] ［実施例３４（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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

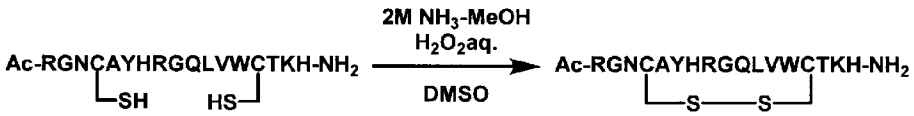
（３４－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＫＨ－NH_2（配列番号６０）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物（６６．３ｍｇ，３２．０μｍｏｌ）を得た。

[0795] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　６９１．１０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５１８．５５［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0796] （３４－２）Ａｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＫＨ－NH_2（配列番号６０）の４位と１４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化126]



上記アミノ酸配列は、配列番号６０である。

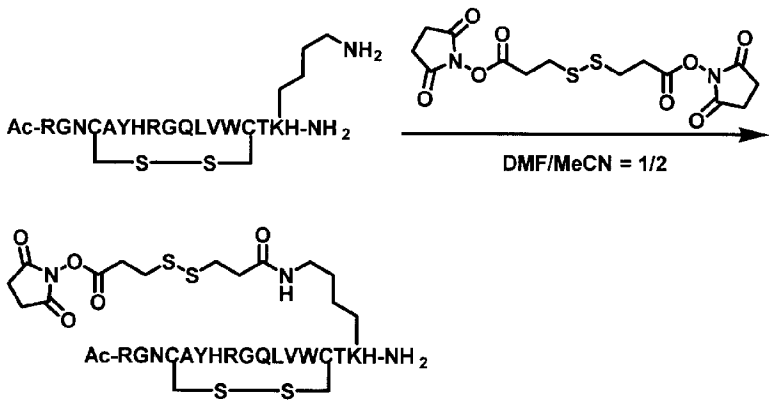
[0797] （３４－１）で合成したペプチド（６６．３ｍｇ，３２．０μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５．００ｍＬ）に溶解し、２Ｍ　NH_3－ＭｅＯＨ（３２．０μＬ，６４．０μｍｏｌ）、過酸化水素水（６５．４μＬ，６４０μｍｏｌ）を加え室温で２０時間攪拌を行った。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液

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（４０．０ｍｇ，１９．３μｍｏｌ）を得た。

[0798] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　６９０．４０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５１８．０５［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0799] （３４－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化127]



上記アミノ酸配列は、配列番号６０である。

[0800] （３４－２）で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＲＧＱＬＶＷＣＴＫＨ－ＮＨ$_2$（配列番号６０）（４０．０ｍｇ，１９．３μｍｏｌ、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）（３１２ｍｇ，７７２μｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（４．５０ｍｇ，１．９１μｍｏｌ）を得た。

[0801] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　７８６．８５［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｍ／ｚ：ｚ＝４　５９０．４５［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

ＨＰＬＣ純度：７８％

[0802] （３４－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

（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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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１４８０８１にピークが観測された。

[0803] （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

（３４－４）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、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。

[0804] （３４－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３４－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0805] 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；

[0806] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ １０．０６１０分はトラスツズマブ原料由来の化合物であると考えられる。また、１１．０６６６分にピークが確認された（図４５）。

[0807] ［実施例３５：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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

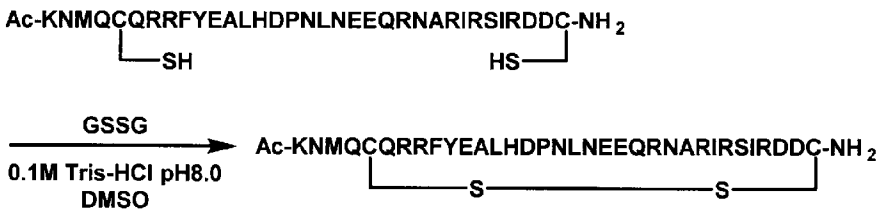
Ａｃ－ＫＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６１）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ Ｒｅｓｉｎ ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝９４：２．５：１．０：２．５の溶液中３時間攪拌の条件で行った。切り出し後Ｒ

ｅｓｉｎ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澱を行い、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０．０５％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、目的物（４７．０ｍｇ，１１．０μｍｏｌ）を得た。

[0808] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ８５３．３５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７１１．２５ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0809] （３５－２）Ａｃ－ＫＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６１）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化128]



上記アミノ酸配列は、配列番号６１である。

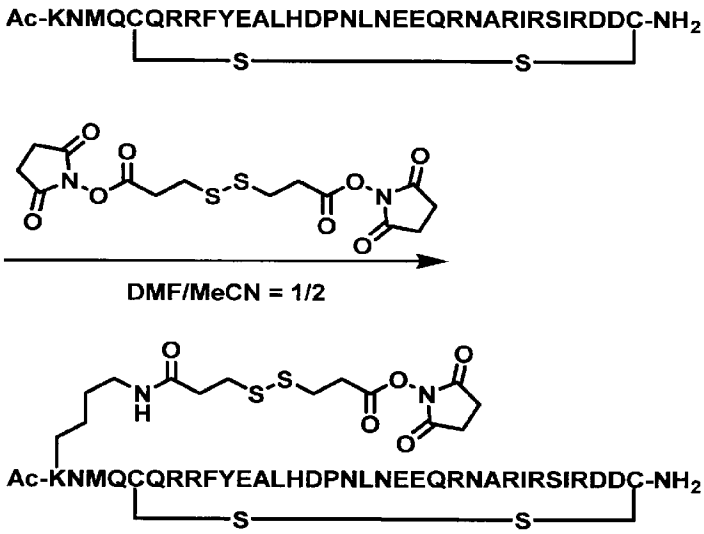
[0810] （３５－１）で合成したペプチド（４７．０ｍｇ，１１．０μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（１．１０ｍＬ）に溶解し、０．１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０（１１．０ｍＬ）を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型（３４．０ｍｇ，５５．０μｍｏｌ）を加えて室温で２０時間攪拌した。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを０．０５％トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸０．０

５％を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、目的物（１８．１ｍｇ，４．２５μｍｏｌ）を得た。

[0811] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ８５２．９５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７１０．９５ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0812] （３５－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化129]



上記アミノ酸配列は、配列番号６１である。

[0813] （３５－２）で合成したＡｃ－ＫＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－ＮＨ$_2$（配列番号６１）（１８．１ｍｇ，４．２５μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（６９．０ｍｇ，０．１７０ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（４．００ｍｇ，０．８０μｍｏｌ）を得た。

[0814] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ９１０．８５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７５９．２０ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：６０％

[0815] （３５－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ ５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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１４８２３４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１５２６７２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１５７１０７にピークが確認された。

[0816] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８４、５０８４４にピークが観測された。

[0817] （３５－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３５－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0818] 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　１０等量；

[0819] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．０５４２分はトラスツズマブ原料、９．４４８１分はペプチドが１個導入された化合物、８．５５２２分はペプチドが２つ導入された化合物であると考えられる（図４６）。

[0820] ［実施例３６：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（３６－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

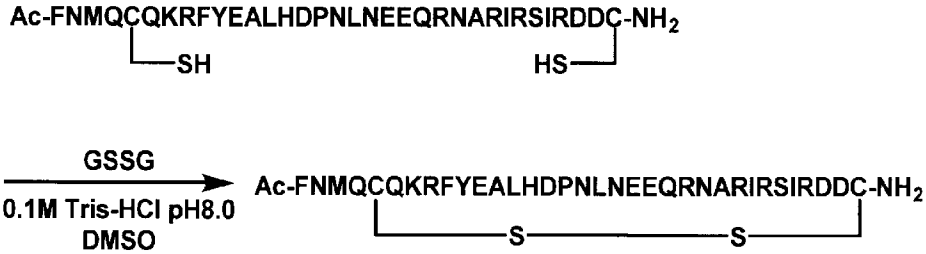
Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＫＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６２）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ　ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチジン（Ｈ）はダブルカップリングを行った。Ｒｅｓｉｎからの切り出しはト

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澱を行い、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０．０５％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、目的物（７６．３ｍｇ，１８．０μｍｏｌ）を得た。

[0821] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ８５１．４５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７０９．７５ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0822] （３６－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＫＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６２）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化130]



上記アミノ酸配列は、配列番号６２である。

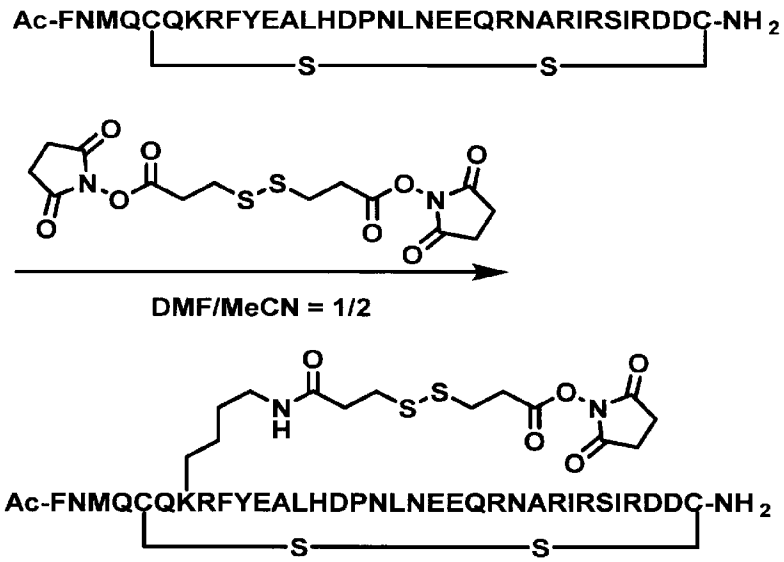
[0823] （３６－１）で合成したペプチド（７６．３ｍｇ，１８．０μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（１．８０ｍＬ）に溶解し、０．１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０（１８．０ｍＬ）を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型（５５．０ｍｇ，８９．５μｍｏｌ）を加えて室温で２０時間攪拌した。反応溶液に２Ｍトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを０．０５％トリフ

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０．０５％を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、目的物（２８．５ｍｇ，６．７１μｍｏｌ）を得た。

[0824] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ８５１．０５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７０９．４０ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0825] （３６－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化131]



上記アミノ酸配列は、配列番号６２である。

[0826] （３６－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＱＫＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－ＮＨ$_2$（配列番号６２）（２８．５ｍｇ，６．７１μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（１０８ｍｇ，０．２６８ｍｍｏｌ）をアセトニトリル（２．００ｍＬ）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（７．１０ｍｇ，１．５６μｍｏｌ）を得た。

[0827] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ９０９．０５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７５７．７０ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：８７％

[0828] （３６－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを１０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ ５．５）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１４８２３２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１５２６６４にピークが観測された。

[0829] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８１にピークが観

測された。

[0830] （３６－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３６－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0831] 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；

[0832] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．６６２０分はトラスツズマブ原料、１０．３２３７分はペプチドが１個導入された化合物であると考えられる（図４７）。

[0833] ［実施例３７：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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

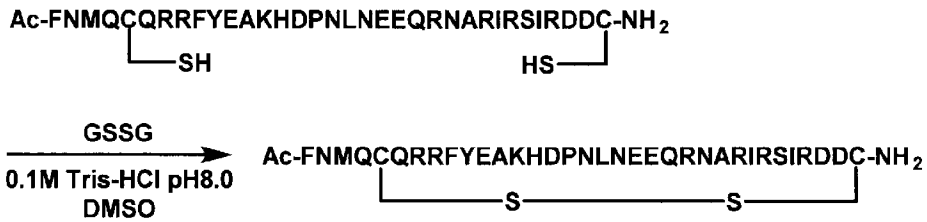
Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＫＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６３）の配列をＦｍｏｃ固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はＣＥＭ社製Ｌｉｂｅｒｔｙ　Ｂｌｕｅを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ＲｅｓｉｎはＦｍｏｃ－ＮＨ－ＳＡＬ－ＰＥＧ　Ｒｅｓｉｎ　ＨＬ、アルギニン（Ｒ）、システイン（Ｃ）ヒスチ

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澱を行い、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０．０５％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、目的物（６７．４ｍｇ，１５．７μｍｏｌ）を得た。

[0834] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ８６０．１０ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７１６．９５ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0835] （３７－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＫＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６３）の５位と３４位のＣｙｓ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６３である。

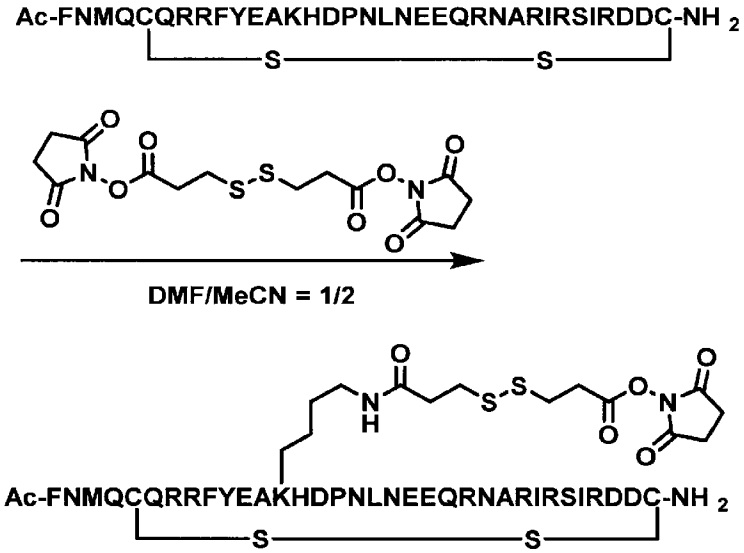
[0836] （３７－１）で合成したペプチド（６７．４ｍｇ，１５．７μｍｏｌ）をＤＭＳＯ（１．５０ｍＬ）に溶解し、０．１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０（１５．０ｍＬ）を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型（４８．０ｍｇ，７８．５μｍｏｌ）を加えて室温で２０時間攪拌した。反応溶液に

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、目的物（１６．１ｍｇ，３．７５μｍｏｌ）を得た。

[0837] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ８５９．７５ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７１６．６０ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0838] （３７－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化133]



上記アミノ酸配列は、配列番号６３である。

[0839] （３７－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＫＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－ＮＨ$_2$（配列番号６３）（１６．１ｍｇ，３．７５μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（６１．０ｍｇ，０．１５０ｍｍｏｌ）をアセトニトリル

（２．００ｍＬ）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（５．３０ｍｇ，１．１６μｍｏｌ）を得た。

[0840] ＭＳ （ＥＳＩ） ｍ／ｚ： ｚ＝５ ９１７．６０ ［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７６４．８５ ［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：５４％

[0841] （３７－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

（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２１．６ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを１０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ ５．５）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１４８２３８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１５２７０３にピークが観測された。

[0842] （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

（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

、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８２にピークが観測された。

[0843] （３７－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３７－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0844] 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；

[0845] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ ９．５８０２分はトラスツズマブ原料、９．１０３１分はペプチドが１個導入された化合物であると考えられる（図４８）。

[0846] ［実施例３８：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

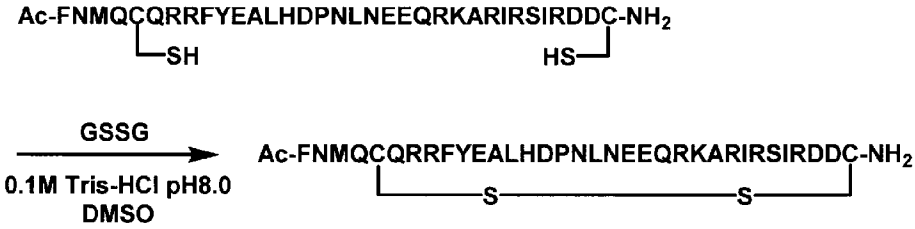
（３８－１）ＩｇＧ１ Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＫＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６４）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物を得た。

[0847] （３８－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＫＡ

ＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６４）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化134]



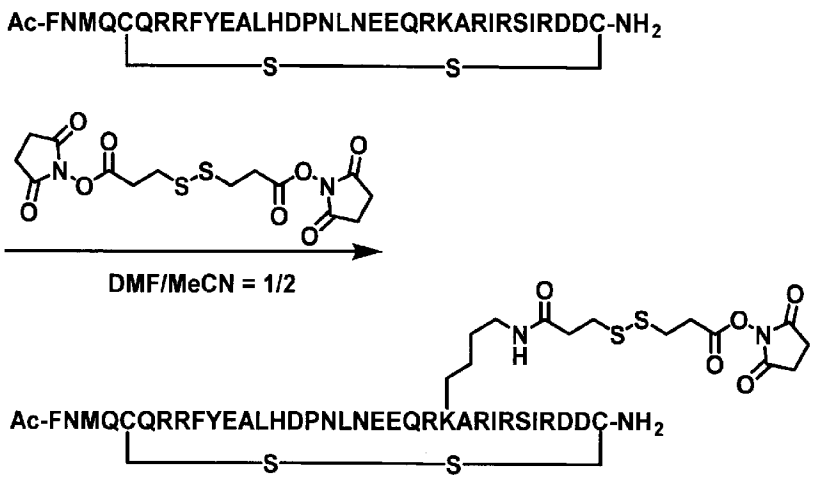
上記アミノ酸配列は、配列番号６４である。

[0848] （３８－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で２０時間攪拌した。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０．０５％を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、目的物（２０．０ｍｇ，４．６６μｍｏｌ）を得た。

[0849] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝４　１０７４．１５［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$，ｚ＝５　８５９．６５［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$

[0850] （３８－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化135]



上記アミノ酸配列は、配列番号６４である。

[0851] （３８－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＫＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６４）（２０．０ｍｇ，４．６６μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（７５．４ｍｇ，１８６μｍｏｌ）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（９．００ｍｇ，１．９６μｍｏｌ）を得た。

[0852] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ： ｚ＝５ ９１７．４５［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６ ７６４．６５［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：１００％

[0853] （３８－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

（３８－３）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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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１４８０７０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１５２５３８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１５７１６５にピークが観測された。

[0854] （３８－５）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

（３８－４）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、生成物は重鎖にチオプロピオニルが導入された５０６８５、５０８４７および、原料と同じ２３４３９に軽鎖ピークが観測された。

[0855] （３８－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３８－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[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　１０等量；

[0857] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．７８２０分はトラスツズマブ原料、９．３３７０分はペプチドが１個導入された化合物、８．７３１３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４９）。

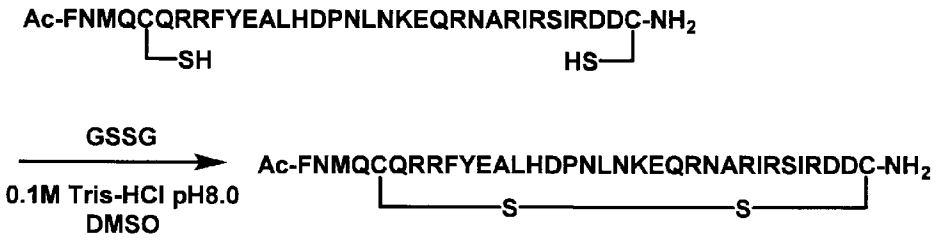
[0858] ［実施例３９：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（３９－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＫＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６５）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物を得た。

[0859] （３９－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＫＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６５）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化136]



上記アミノ酸配列は、配列番号６５である。

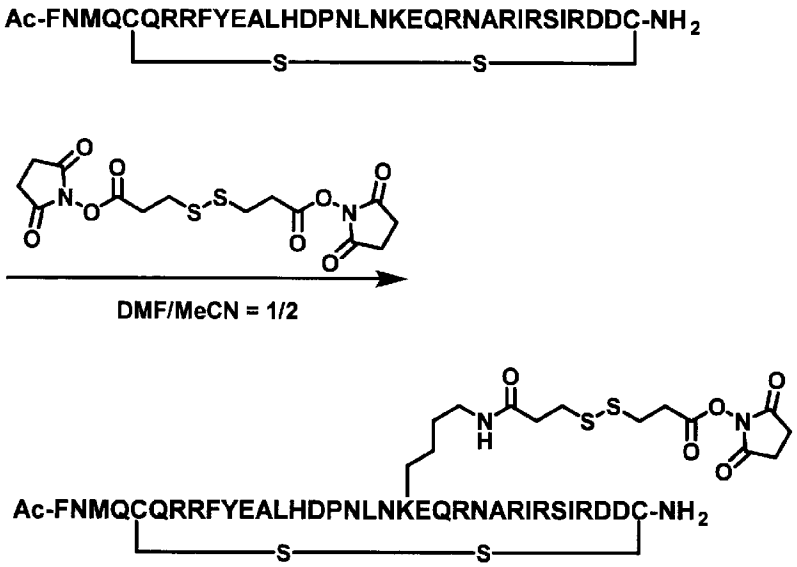
[0860] （３９－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍ　Ｔｒｉ

ｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で２０時間攪拌した。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０．０５％を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、目的物（２３．０ｍｇ，５．３８μｍｏｌ）を得た。

[0861] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝４　１０７０．５５［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$，ｚ＝５　８５６．５５［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$

[0862] （３９－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化137]



上記アミノ酸配列は、配列番号６５である。

[0863] （３９－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＫＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号６５）（２３．０ｍｇ，５．３８μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（８７．０ｍｇ，２１５μｍｏｌ）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（１６．０ｍｇ，３．５０μｍｏｌ）を得た。

[0864] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝５　９１４．４５［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６　７６２．１５［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：８３％

[0865] （３９－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を４．２μＬ（抗体に対して５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１４８０６５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１５２５２５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１５６９７８にピークが観測された。

[0866] （３９－５）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（３９－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0867] 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 ５等量；

[0868] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ Ｔｉｍｅ ９．２１２４分はペプチドが１個導入された化合物、８．６１５７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５０）。

[0869] ［実施例４０：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］

（４０－１）トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

１．５ｍＬ低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を１０μＬ、５０ｍＭ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２０ｍＭのジチオスレイトール水溶液１０μＬを加えて６５℃で１時間加温後、５０ｍＭのヨードアセトアミド水溶液１０μＬを添加し、遮光下室温で３０分間３００ｒｐｍで振盪し反応させた。反応後、５０ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を４０μＬ加えて撹拌し、２０ｎｇ／μＬのトリプシン水溶液（Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ Ｇｒａｄｅ，Ｃｏｄｅ Ｎｏ．Ｔ６５６７－５ｘ２０μｇ（ＳＩＧＭＡ））を１０μＬ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２μＬ添加し反応を止め、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定を実施した。

[0870] （４０－２）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）

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）

[0871]（ＨＰＬＣ分析条件）

トラップカラム：Ａｃｃｌａｉｍ　ＰｅｐＭａｐ（登録商標）　１００，７５μｍｘ２ｃｍ（サーモフィッシャーサイエンティフィック）

分析カラム：ＥＳＩ－ｃｏｌｕｍｎ（ＮＴＣＣ－３６０／７５－３－１２５，７５μｍ×１２．５ｃｍ，３μｍ（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：３００ｎＬ／ｍｉｎ

サンプル注入量：１μＬ

グラジエント条件（Ｂ％）：２％（０．０－０．５分）、２％→３０％（０．５－２３．５分）、３０％→７５％（２３．５－２５．５分）、７５％（２５．５－３５.０分）

[0872]（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　Ａｑｕｉｓｉｔｉｏｎ　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）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）を用いて行った。

[0873]（４０－３）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）を用いて行った。

[0874] Ｐｒｏｔｅｏｍｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｅｒでの解析は、ＳｅｑｕｅｓｔＨＴ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３５０～５０００Ｄａ、Ｔｏｔａｌ Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄを５００００とした。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。

[0875] 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８に示される（１）、（３）を用いた。

[0876] （４０－４）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、実施例３９のバインダーペプチドを用いて修飾した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１９残基からなるペプチド、ＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ（配列番号６６）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ ７９１．７４８７２、理論値７９１．７４７５３、３価）が観測され（図５１）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける３１７位のリジ

ン残基の修飾を示す、２価のｂ１８に相当するｍ／ｚ　１１１４．３５（理論値：１１１４．０６）のプロダクトイオンが確認された（図５２）。また、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２８残基からなるペプチド、ＥＥＱＹＤＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ（配列番号６７）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　８８６．９３４０８、理論値：８８６．９３２１５、４価）が観測され（図５３）、ＣＩＤスペクトルより同じく重鎖の３１７位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ１４に相当するｍ／ｚ　９３８．７０（理論値：９３８．４６）のプロダクトイオンが確認された（図５４）。

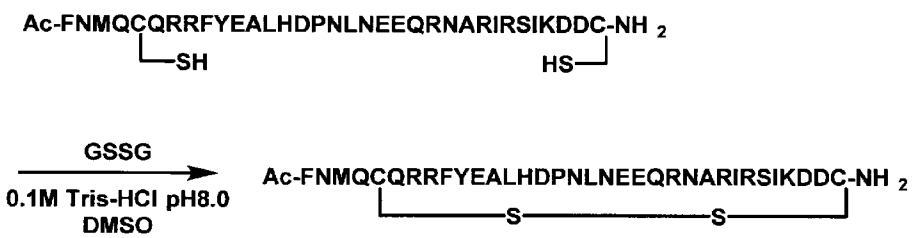
[0877] ［実施例４１：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（４１－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ－NH_2（配列番号６８）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物を得た。

[0878] （４１－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ－NH_2（配列番号６８）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化138]



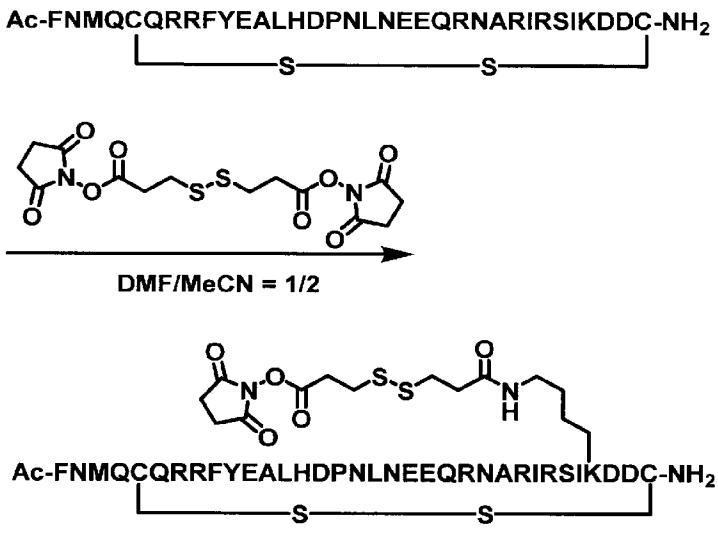
上記アミノ酸配列は、配列番号６８である。

[0879] （４１－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で２０時間攪拌した。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０．０５％を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、目的物（２０．０ｍｇ，４．７０μｍｏｌ）を得た。

[0880] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝４　１０６３．６５［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$，ｚ＝５　８５１．１５［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$

[0881] （４１－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化139]



上記アミノ酸配列は、配列番号６８である。

[0882] （４１－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ－NH_2（配列番号６８）（２０．０ｍｇ，

４．７０μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（７６．０ｍｇ，１８８μｍｏｌ）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（１２．０ｍｇ，２．６３μｍｏｌ）を得た。

[0883] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝５　９０８．９５［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６　７５７．７５［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：８３％

[0884] （４１－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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１４８２３４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１５２６４８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１５７０８３にピークが観測された。

[0885] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８６、５０８４７および、原料と同じ２３４３９に軽鎖ピークが観測された。

[0886] （４１－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（４１－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0887] 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　１０等量；

[0888] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．７２０２分はトラスツズマブ原料、９．２６８９分はペプチドが１個導入された化合物、８．７９９４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）。

[0889] ［実施例４２：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］

（４２－１）トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

（４０－１）と同じ処理を行った。

[0890] （４２－２）トラスツズマブのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定条件

（４０－２）と同じ測定条件を用いた。

[0891] （４２－３）トラスツズマブの修飾部位の解析条件

（４０－３）と同じ解析条件を用いた。

[0892] （４２－４）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、実施例４１のバインダーペプチドを用いて修飾した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１８残基からなるペプチド、ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲ（配列番号６９）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　７６９．０４６８８、理論値：７６９．０４４５７、３価）が観測され（図５６）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２８８位もしくは２９０位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ１２に相当するｍ／ｚ　７４１．１５（理論値：７４０．８９）のプロダクトイオンが確認された（図５７）。

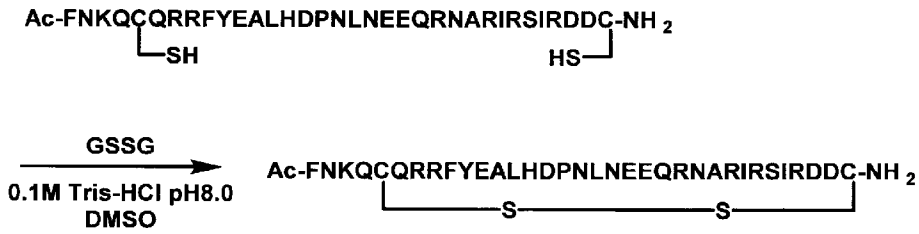
[0893] ［実施例４３：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

（４３－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＦＮＫＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号７０）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物を得た。

[0894] （４３－２）Ａｃ－ＦＮＫＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号７０）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化140]



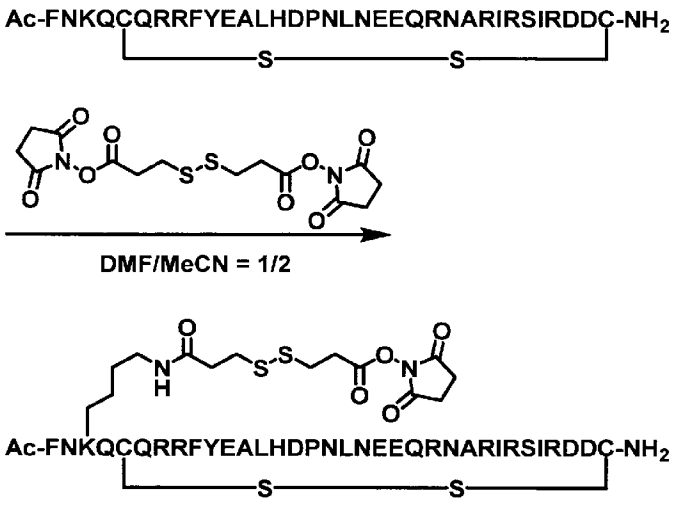
上記アミノ酸配列は、配列番号７０である。

[0895] （４３－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で２０時間攪拌した。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０．０５％を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、目的物（２０．０ｍｇ，４．６７μｍｏｌ）を得た。

[0896] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝５　８４８．３０［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$，ｚ＝６　７０７．１０［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

[0897] （４３－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化141]



上記アミノ酸配列は、配列番号７０である。

[0898] （４３－２）で合成したＡｃ－ＦＮＫＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号７０）（２０．０ｍｇ，４．６７μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（７６．０ｍｇ，１８８μｍｏｌ）をアセトニトリル（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（９．００ｍｇ，１．９７μｍｏｌ）を得た。

[0899] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝６　７６１．８５［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：８５％

[0900] （４３－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

（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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ１０００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）３４２μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を１７．０μＬ（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（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、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が１５６９６３にピークが確認された。

[0901] （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

（４３－４）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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８６、５０８４７および、原料と同じ２３４３９に軽鎖ピークが観測された。

[0902] （４３－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（４３－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0903] 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　１０等量；

[0904] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　８．６２５１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５８）。

[0905] ［実施例４４：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］

（４４－１）トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

１．５ｍＬ低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を１０μＬ、５０ｍＭ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２０ｍＭのジチオスレイトール水溶液１０μＬを加えて６５℃で１時間加温後、５０ｍＭのヨードアセトアミド水溶液１０μＬを添加し、遮光下室温で３０分間３００ｒｐｍで振盪し反応させた。反応後、５０ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液を４０μＬ加えて撹拌し、２０ｎｇ／μＬのトリプシン水溶液を１０μＬ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２μＬ添加し反応を止めた。その後、５０ｍＭ炭酸水素アンモニウム緩衝液、０．５％トリフルオロ酢酸を用いて１０倍希釈し、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定に使用した。

[0906] （４４－２）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）

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）

[0907] （ＨＰＬＣ分析条件）

トラップカラム：Ａｃｃｌａｉｍ　ＰｅｐＭａｐ（登録商標）　１００，７５μｍｘ２ｃｍ（サーモフィッシャーサイエンティフィック）

分析カラム：ＥＳＩ－ｃｏｌｕｍｎ（ＮＴＣＣ－３６０／７５－３－１２５

，７５μｍ×１２．５ｃｍ，３μｍ（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：３００ｎＬ／ｍｉｎ

サンプル注入量：１μＬ

グラジエント条件（Ｂ％）：２％（０．０－０．５分）、２％→３０％（０．５－２３．５分）、３０％→７５％（２３．５－２５．５分）、７５％（２５．５－３５．０分）

[0908]（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　Ａｑｕｉｓｉｔｉｏｎ　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）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）を用いて行った。

[0909]（４４－３）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）を用いて行った。

[0910]　Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｅｒでの解析は、ＳｅｑｕｅｓｔＨＴ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３５０～５０００Ｄａとした。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５ｐｐｍおよび０．５Ｄａとした。Ｓｔａｔｉｃ　Ｍｏｄｉｆｉｃ

ａｔｉｏｎ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。実施例４３のみ、Ｔｏｔａｌ　Ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ　Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄを３２０００とした。

[0911] 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８に示される（１）、（３）を用いた。

[0912] （４４－４）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４０）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　９５２．２３１４５、理論値：９５２．２２９００、４価）が観測され（図５９）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４６位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ１５に相当するｍ／ｚ　９６８．３０（理論値：９６８．０１）のプロダクトイオンが確認された（図６０）。

[0913] ［実施例４５：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ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの修飾およびその解析］

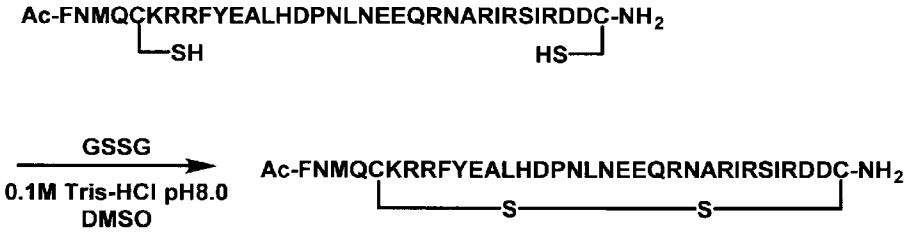
（４５－１）ＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドの合成

Ａｃ－ＦＮＭＱＣＫＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩ

ＲＤＤＣ－ＮＨ$_2$（配列番号７１）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物を得た。

[0914] （４５－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＫＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－ＮＨ$_2$（配列番号７１）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化142]



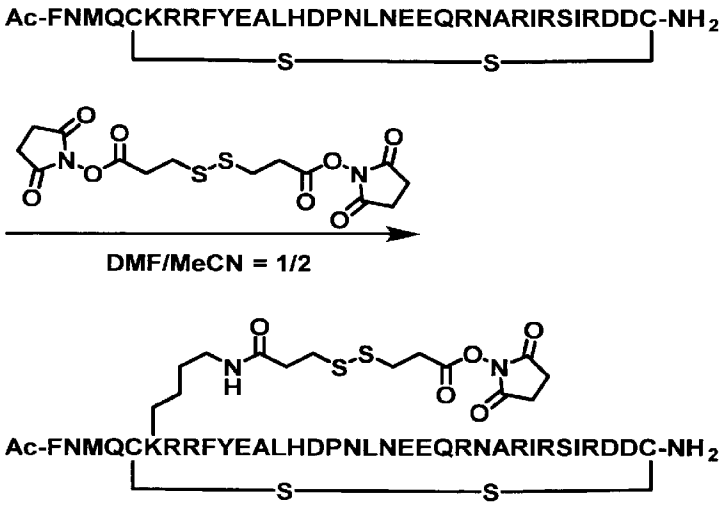
上記アミノ酸配列は、配列番号７１である。

[0915] （４５－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で２０時間攪拌した。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０．０５％を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、目的物（２０．０ｍｇ，４．６７μｍｏｌ）を得た。

[0916] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　６９２．７０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５１９．８０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0917] （４５－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化143]



上記アミノ酸配列は、配列番号７１である。

[0918] （４５－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＫＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ－NH_2（配列番号７１）（２０．０ｍｇ，４．６７μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（７６．０ｍｇ，１８８μｍｏｌ）をアセトニトリル（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（５．５０ｍｇ，１．２０μｍｏｌ）を得た。

[0919] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝６　７６２．４０［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：１００％

[0920] （４５－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

（４５－２）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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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（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１４８２２６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１５２６６２にピークが確認された。

[0921] （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

（４５－３）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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８６、５０８４７および、原料と同じ２３４３９に軽鎖ピークが観測された。

[0922] （４５－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（４５－３）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_4）$_2SO_4$，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。

[0923] 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　１０等量；

[0924] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．８９５４分はトラスツズマブ原料、９．４８９２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６１）。

[0925] ［実施例４６：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］

（４６－１）トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

（４４－１）と同じ処理を行った。

[0926] （４６－２）トラスツズマブのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定条件

（４４－２）と同じ測定条件を用いた。

[0927] （４６－３）トラスツズマブの修飾部位の解析条件

（４４－３）と同じ解析条件を用いた。

[0928] （４６－４）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４０）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　９５２．２２９６８、理論値：９５２．２２９００、４価）が観測され（図６２）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２４６位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ１２に相当するｍ／ｚ　７６４．６０（理論値：７６４．４０）のプロダクトイオンが確認された（図６３）。

[0929] ［実施例４７：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ＨＥＲ２ＩｇＧ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－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＫＤＣ－NH_2（配列番号７２）の配列を実施例１と同様にＦｍｏｃ固相合成法により合成した。目的物を得た。

[0930] （４７－２）Ａｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＫＤＣ－NH_2（配列番号７２）の５位と３４位のＣｙｓでの分子内ジスルフィド結合の形成

[化144]



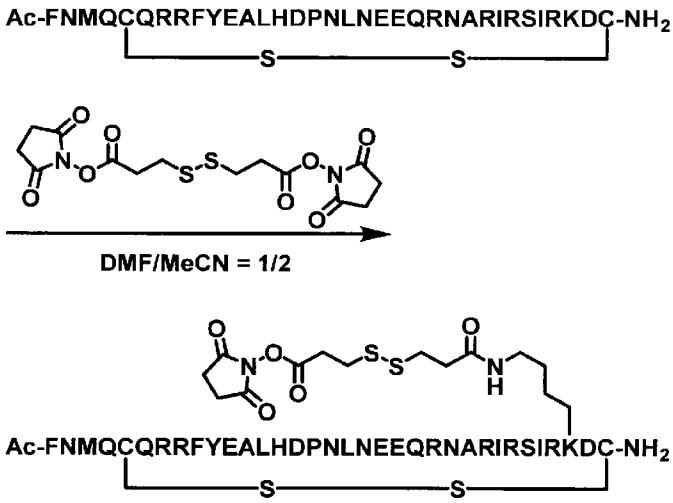
上記アミノ酸配列は、配列番号７２である。

[0931] （４７－１）で合成したペプチドをＤＭＳＯに溶解し、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ　８．０を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で２０時間攪拌した。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０．０５％を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、目的物（２４．５ｍｇ，５．７１μｍｏｌ）を得た。

[0932] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝３　６９２．７０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$，ｚ＝４　５１９．８０［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$

[0933] （４７－３）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

[化145]



上記アミノ酸配列は、配列番号７２である。

[0934] （４７－２）で合成したＡｃ－ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＫＤＣ－NH_2（配列番号７２）（２４．５ｍｇ，５．７１μｍｏｌ、ただし５番目と３４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）（９２．２ｍｇ，２２８μｍｏｌ）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（７．５０ｍｇ，１．６４μｍｏｌ）を得た。

[0935] ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：ｚ＝６　７６２．４０［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$

ＨＰＬＣ純度：８４％

[0936] （４７－４）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ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４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブ５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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（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１４８０８７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１５２６９４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１５７１６０にピークが確認された。

[0937] （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、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された５０６８６、５０８４７および、原料と同じ２３４３９に軽鎖ピークが観測された。

[0938] （４７－６）抗ＨＥＲ２ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（４７－４）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_4）$_2SO_4$，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。

[0939] 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　１０等量；

[0940] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．５７９６分はトラスツズマブ原料、９．１１９９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６４）。

[0941] ［実施例４８：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］

（４８－１）トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

（４４－１）と同じ処理を行った。

[0942] （４８－２）トラスツズマブのＬＣ－ＭＳ／ＭＳ測定条件

（４４－２）と同じ測定条件を用いた。

[0943] （４８－３）トラスツズマブの修飾部位の解析条件

（４４－３）と同じ解析条件を用いた。

[0944] （４８－４）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、ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲ（配列番号６９）のペプチドフラグメントのＭＳスペクトル（実測値：ｍ／ｚ　７６９．０４５２９、理論値：７６９．０４４５７、３価）が観測され（図６５）、ＣＩＤスペクトルより重鎖のＥＵ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇにおける２９０位のリジン残基の修飾を示す、２価のｙ８に相当するｍ／ｚ　５４９．１１（理論値：５４８．７９）のプロダクトイオンが確認された（図６６）。

[0945] ［実施例４９：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）を用いたヒトＩｇＧ２抗体の修飾およびその解析］

（４９－１）ヒトＩｇＧ２抗体の特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例（２－２）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４ｍＭとした。ヒトＩｇＧ２抗体（ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ社製）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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（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ＩｇＧ２抗体は１５３０４７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１５５１２９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１５７６９９にピークが確認された。

[0946] （４９－２）ヒトＩｇＧ２抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（４９－１）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　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，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。

[0947] サンプルについては以下の条件で反応させた。

ａ：ヒトＩｇＧ２抗体原料

ｂ：ヒトＩｇＧ２抗体＋ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性

化体　１０等量；

[0948] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．０２０９分はヒトＩｇＧ２抗体原料、１０．２０４３分はペプチドがヒトＩｇＧ２抗体に１個導入された化合物であると考えられる（図６７）。

[0949] ［実施例５０：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）を用いたヒトＩｇＧ２抗体の修飾およびその解析］

（５０－１）ヒトＩｇＧ２抗体の特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例（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４ｍＭとした。ヒトＩｇＧ２抗体（ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ社製）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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（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ＩｇＧ２抗体は１５３０４７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１５７６５２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１６５０４３にピークが確認された。

[0950] （５０－２）ヒトＩｇＧ２抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（５０－１）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　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，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。

[0951] サンプルについては以下の条件で反応させた。

ａ：ヒトＩｇＧ２抗体原料

ｂ：ヒトＩｇＧ２抗体＋ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体　１０等量；

[0952] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　９．０２０９分はヒトＩｇＧ２抗体原料、８．３８８２分はペプチドがヒトＩｇＧ２抗体に１個導入された化合物であると考えられる（図６８）。

[0953] ［実施例５１：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）を用いたヒトＩｇＧ４抗体の修飾およびその解析］

（５１－１）ヒトＩｇＧ４抗体の特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例（２－２）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４ｍＭとした。ヒトＩｇＧ４抗体（ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ社製）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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（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ＩｇＧ２抗体は１５４６１８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１５９１３０にピークが確認された。

[0954] （５１－２）ヒトＩｇＧ４抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（５１－１）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　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，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。

[0955] サンプルについては以下の条件で反応させた。

ａ：ヒトＩｇＧ４抗体原料

ｂ：ヒトＩｇＧ４抗体＋ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体　１０等量；

[0956] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．３１５４分はヒトＩｇＧ４抗体原料、１１．２４５０分はペプチドがヒトＩｇＧ４抗体に１個導入された化合物であると考えられる（図６９）。

[0957] ［実施例５２：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）を用いたヒトＩｇＧ４抗体の修飾およびその解析］

（５２－１）ヒトＩｇＧ４抗体の特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例（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４ｍＭとした。ヒトＩｇＧ２抗体（ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ社製）５００μｇを５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ　５．５）１７１μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を８．５μＬ（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（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ＩｇＧ２抗体は１５４６１８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１６３５３０にピークが確認された。

[0958] （５２－２）ヒトＩｇＧ４抗体の特異的修飾のＨＩＣ－ＵＰＬＣ解析

（５２－１）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　２．５μｍを使用した。Ａ＿Ｂｕｆｆｅｒ：０．１Ｍ　ＰｉＮａ，２．３Ｍ（NH_4）$_2SO_4$，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。

[0959] サンプルについては以下の条件で反応させた。

ａ：ヒトＩｇＧ４抗体原料

ｂ：ヒトＩｇＧ４抗体＋ペプチドジスルフィドリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体　１０等量；

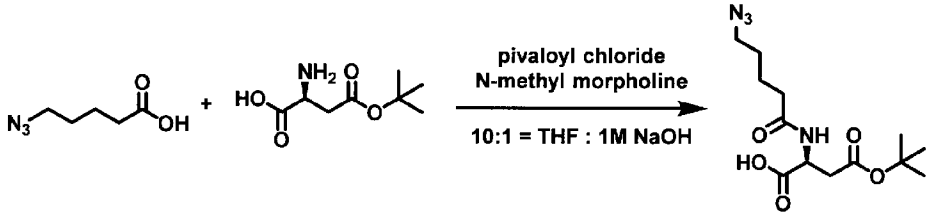
[0960] Ｒｅｔｅｎｓｉｏｎ　Ｔｉｍｅ　１０．３１５４分はヒトＩｇＧ４抗体原料、８．８６４５分はペプチドがヒトＩｇＧ４抗体に１個導入された化合物であると考えられる（図７０）。

[0961] ［実施例５３：（１）切断性リンカーの合成、ならびに（２）合成したリンカーとＩｇＧ１　Ｆｃ結合性ペプチドとの連結による、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－アジド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体）の合成］

（５３－１）チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

（５３－１－１）チオエステルリンカーの合成

[化146]

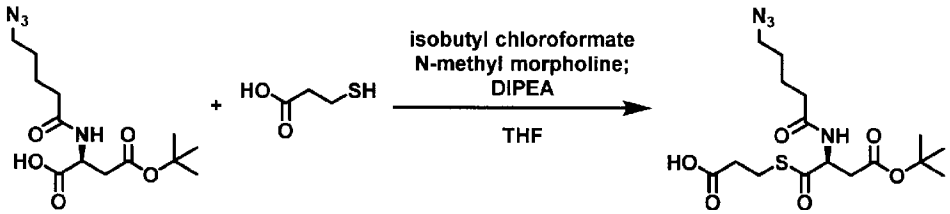


[0962] ５－アジドペンタン酸（２００ｍｇ，１．４０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ溶媒（１２ｍＬ）に溶解させ、０℃にてピバロイルクロリド（２０６μＬ，１．６

８ｍｍｏｌ）、Ｎ－メチルモルホリン（２３０μＬ，２．１０ｍｍｏｌ）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。室温にて４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－アミノ－ブタン酸（３４４ｍｇ、１．８２ｍｍｏｌ）を１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（１．８２ｍＬ）に溶解させたのち、前述の５－アジドペンタン酸の混合酸無水物のＴＨＦ溶液を室温にて滴下した。室温にて１６時間攪拌した後、６Ｍ塩酸水溶液を加え、系内のｐＨを３．０に調整した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより粗生成物を得たのち、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、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（５－アジドペンター１－オキソ）アミノ－ブタン酸（３２０ｍｇ，１．０２ｍｍｏｌ）を得た。

[0963] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：３３７［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$

[0964] [化147]



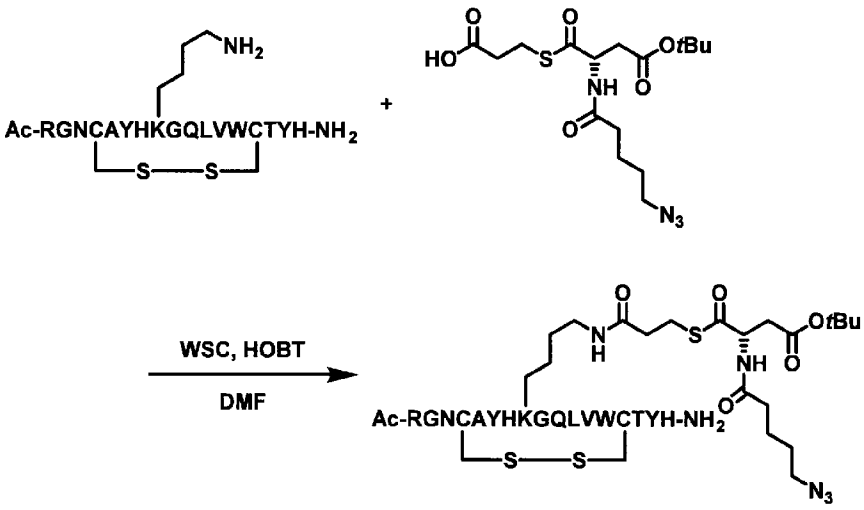
[0965] ４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（５－アジドペンター１－オキソ）アミノ－ブタン酸（１５４ｍｇ，０．４９０ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（４．９ｍＬ）に溶解させ、０℃にてクロロ炭酸イソブチル（　８３．６μＬ，０．６３７ｍｍｏｌ）、Ｎ－メチルモルホリン（１０８μＬ，０．９８０ｍｍｏｌ）を加え３０分攪拌し、対応する混合酸無水物を調整した。室温にてメルカプトプロピオン酸（１２８μＬ、１．４７ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２５３μＬ、１．４７ｍｍｏｌ）を、前述の混合

酸無水物のＴＨＦ溶液を室温にて滴下した。室温にて１６時間攪拌した後、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加え、系内のｐＨを９．０に調整した。反応液を水と酢酸エチルで洗浄し、水相を回収した。水相に６Ｍ塩酸水溶液を加え、系内のｐＨを３．０に調整した後、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、有機相を食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え５分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、３－［４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（５－アジドペンター１－オキソ）アミノ－１－オキソ］スルファニル－プロパン酸（１０８ｍｇ，０．２６８ｍｍｏｌ）を得た。

[0966] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：４０３［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$

[0967] （５３－１－２）チオエステルリンカーとペプチドの連結

[化148]



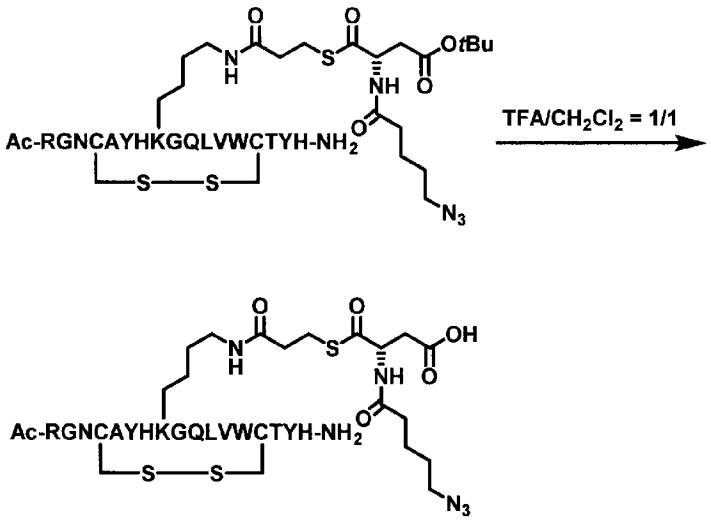
上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0968] 実施例１－２で合成したＡｃ－ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ－ＮＨ２（配列番号３９）のペプチド（３１．８ｍｇ，１５．３μｍｏｌ、ただし、４番目と１４番目の２つのホモシステインは、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１ｍＬに溶解し、３－［４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ－オキソ）－２－（５－アジドペンター１－オキソ）アミノ－１－オキソ］－スルファニル－プロパン酸（６

１．７ｍｇ，０．１５３ｍｍｏｌ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（２９．４ｍｇ，０．１５３ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１０．４ｍｇ，０．０７６６ｍｍｏｌ）をＤＭＦ１ｍＬに溶解させ、系中に加えた。室温で２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－ｔＢｕ体（２．５ｍｇ，１．０２μｍｏｌ）を得た。

[0969] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝２　１２３０［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　８２０［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0970] [化149]

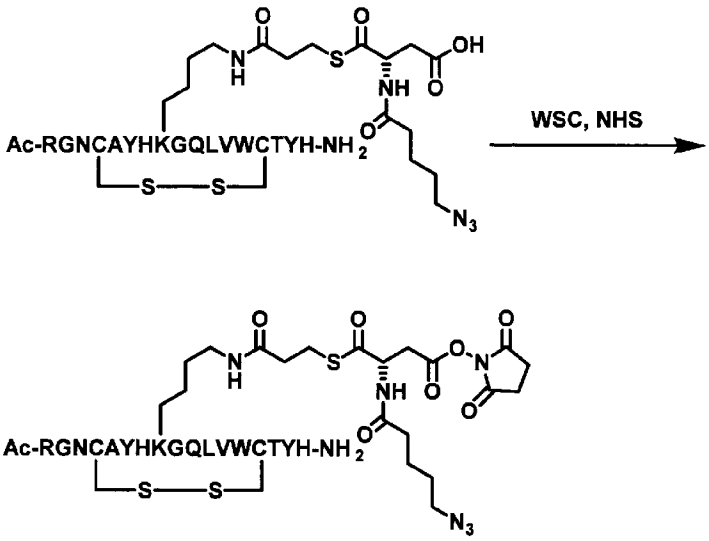


上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0971] 上記ペプチドリンカー連結物（２．５ｍｇ，１．０２μｍｏｌ）をジクロロメタン０．２５０ｍＬ中に溶解し、トリフルオロ酢酸を０．２５０ｍＬ加え室温中で１時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、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－カルボン酸体を得た。

[0972] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝２　１２０２［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　８０２［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0973] [化150]



上記アミノ酸配列は、配列番号３９である。

[0974]　上記ペプチドリンカー連結物－カルボン酸体をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド０．５ｍＬに溶解し、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（２．０ｍｇ，１０．２μｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（１．２ｍｇ，１０．２μｍｏｌ）を加え１６時間攪拌した。反応液に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－アジド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体（０．５ｍｇ，０．２μｍｏｌ）を得た。

[0975] ＭＳ（ＥＳＩ）　ｍ／ｚ：ｚ＝２　１２５１［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$，ｚ＝３　８３４［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$

[0976] ［実施例５４：抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾、ならびにＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析］

（５４－１）アジド修飾チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬によるＩ

ｇＧ抗体トラスツズマブの特異的修飾とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

実施例５３の（５３－１－２）で合成したペプチド－アジド修飾チオエステルリンカー連結物－ＮＨＳ活性化体はＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドに溶解し４ｍＭとした。抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体トラスツズマブ（中外製薬）１．４８ｍｇを６０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ４．７）５５５μＬに溶解させ、４ｍＭのペプチド試薬を５０μＬ（抗体に対して２０等量）加えて、室温で１時間攪拌し、１００ｍＭクエン酸により反応を停止した。反応液をＡｍｉｃｏｎ　１０Ｋにより９．５７ｍＭ　ＰＢＳバッファー（ｐＨ７．４）へと溶媒置換した。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、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された１５３１４３にピークが観測された。

[0977] （５４－２）抗ＨＥＲ２　ＩｇＧ抗体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

（５４－１）で生成した抗体・ペプチド複合体のＰＢＳ溶液に７ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２．０μＬ（抗体に対して１００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、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された５２９８１および５３１４３にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0978] （５４－３）チオエステルリンカーの切断とＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

任意のバッファー（ｐＨ４．５～ｐＨ９．０）に、（５４－１）で合成した抗体・ペプチドチオエステルリンカー複合体を溶解し、ヒドロキシルアミン水溶液を加え室温で攪拌することで、チオエステル構造が加水分解し、アジド基が抗体上に残る。これをＥＳＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定することができる。

[0979] （５４－４）トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のＥＳＩ－ＴＯＦＭＳによる解析

先ず、（５４－１）で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体１２０μｇを０．５Ｍヒドロキシルアミン水溶液（０．５Ｍヒドロキシルアミン、９．５６ｍＭのＰＢＳ、４．８ｇ／ｍＬのＥＤＴＡを純水に溶解させた水溶液（ｐＨ７．２））に溶解し、室温で攪拌して、リンカー中のチオエステル結合を切断した。ＥＳＩ－ＴＯＦＭＳにより質量を測定したところ、生成物はアジドが二つ導入された１４８４６９にピークが観測された。

[0980] （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７ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液２．０μＬ（抗体に対して１００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、原料の抗体・ペプチド複合体は５２９８１，および５３１４３に重鎖ピーク、２３４４０に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジドが導入された５０８３６および５０９９９にピークが観察され、原料と同じ２３４４０に軽鎖ピークが観測された。

[0981] （まとめ）

以上の結果をまとめると、以下のとおりである。

[0982]

[表2]

表２．親和性ペプチドのまとめ

アミノ酸配列	配列番号	実施例
RGNCAYHKGQLVWCTYH	５１	１～１５
RGNCKYHRGQLVWCTYH	５４	１６
RGNCAWHRGKLVWCTYH	５５	１７
RGNCKWHRGELVWCTYH	５６	１８
RGNCKWHRGQLVWCTYH	５７	１９
RGNCKYHLGELVWCTYH	５８	２０
RGNCKYHLGQLVWCTYH	５９	２１
DCKWHLGELVWCT	６０	２２
DCKYHLGELVWCT	６１	２３
DCKWHRGELVWCT	６２	２４
DCKWHLGQLVWCT	６３	２５
DCKYHRGELVWCT	６４	２６
DCKYHLGQLVWCT	６５	２７
DCKWHRGQLVWCT	６６	２８
DCKYHRGQLVWCT	６７	２９
RGNCAWHLGQLVWCKYH	６８	３０
RGNCAWHLGELVWCKYH	６９	３１
RGNCAYHLGQLVWCTKH	７０	３２
RGNCAYHLGQLVWCTYK	７１	３３
RGNCAYHRGQLVWCTKH	７２	３４
KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	７３	３５
FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	７４	３６
FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	７５	３７
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC	７６	３８
FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC	７７	３９
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC	８０	４１
FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	８２	４３
FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	８３	４５
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC	８４	４７

[0983] 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８、１５、４４、４６）、２８８位及び／又は２９０位のリジン残基（例、実施例４２、実施例４８）、３１７位のリジン残基（例、実施例４０）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。

[0984] さらに、下記式（Ｉ）で表される、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３のとおりである。

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ （Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、

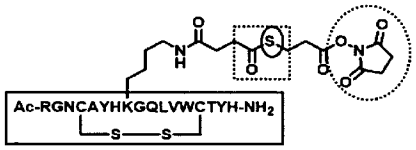
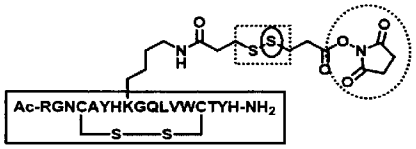
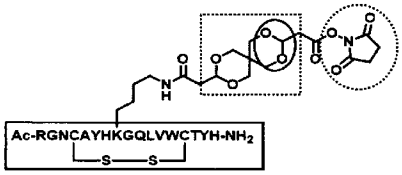
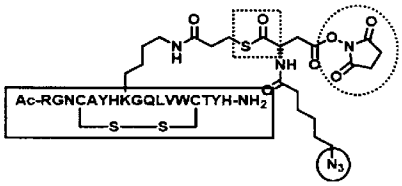
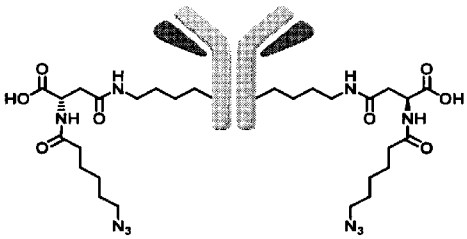
Ｒは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕

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。

[0985]

[表3]

表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可溶性タンパク質（抗体）との関係（その１）

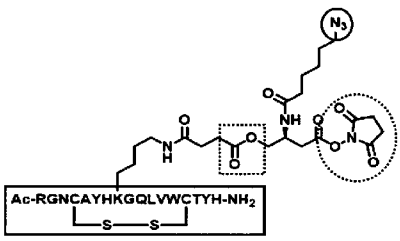
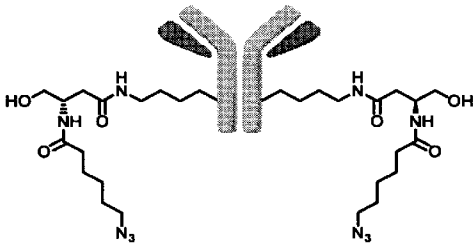
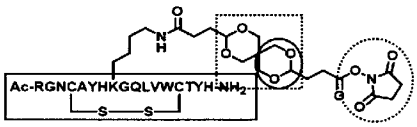
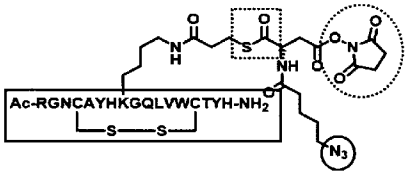
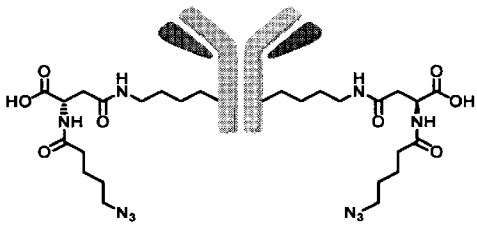
実施例	化合物の具体的構造 □：親和性物質(A) ⬚：切断性部分(L中) ○：生体直交性官能基 B(a)またはL(ii) ⬚：反応性基(R)	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
2-1	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
2-2	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
2-3	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
11-1	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	

*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）

[0986]

[表4]

表４．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可溶性タンパク質（抗体）との関係（その２）

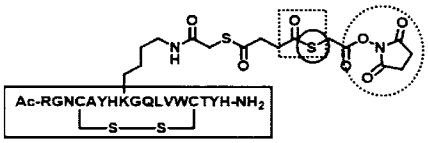
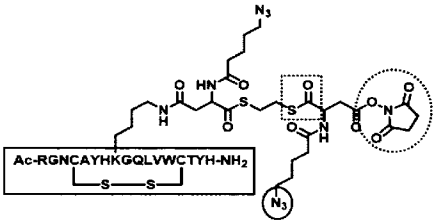
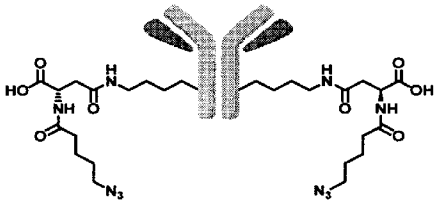
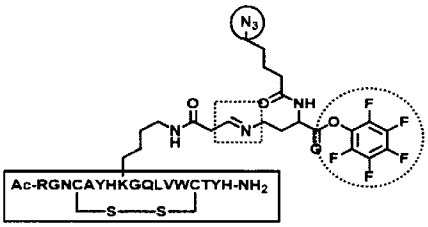
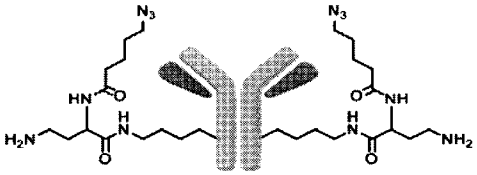
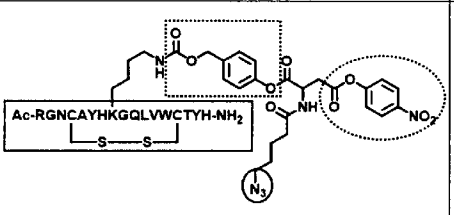
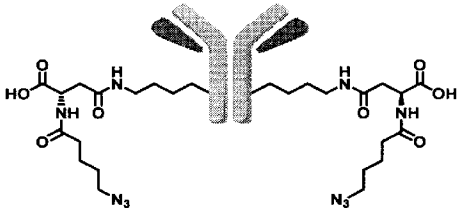
実施例	化合物の具体的構造 □：親和性物質(A) ⬚：切断性部分(L中) ○：生体直交性官能基 B(a)またはL(ii) ⬚：反応性基(R)	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
11-2	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
11-3	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
53	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	

[0987] 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種々の化合物は、上述のように、可溶性タンパク質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）、可溶性タンパク質に対する反応性基（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、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可溶性タンパク質（抗体）との関係は、以下のとおりである。

[0988] [表5]

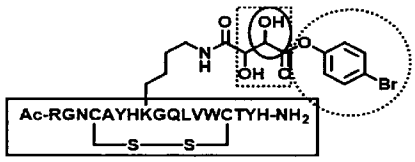
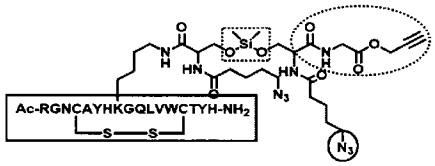
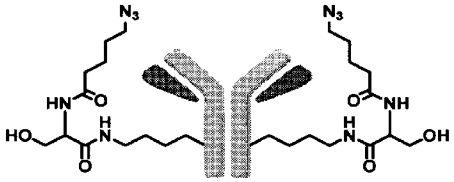
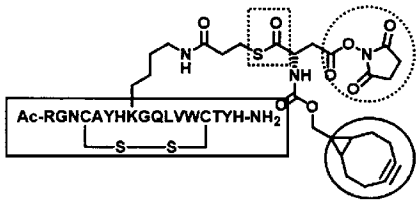
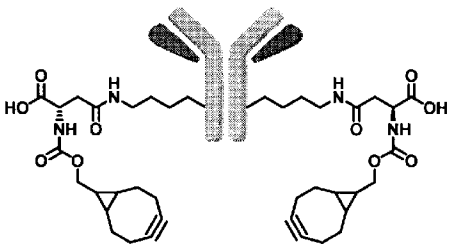
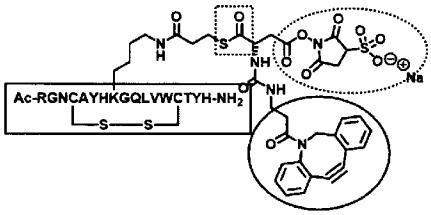
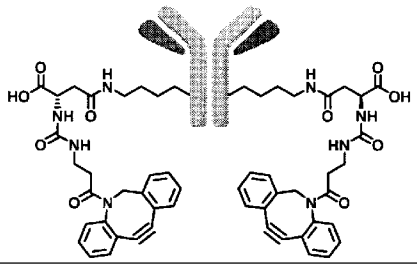
表５．可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その１）

実施例	化合物の具体的構造 □：親和性物質（A） ⬚：切断性部分（L中） ○：生体直交性官能基 B（a）またはL（ii） ⬚：反応性基（R）	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可溶性タンパク質（抗体）＊
55	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
56	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
57	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
58	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	

[0989]

[表6]

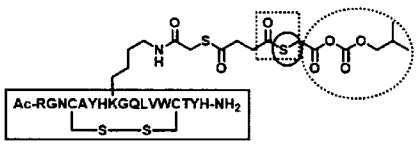
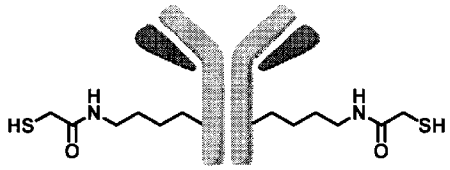
表６．可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その２）

実施例	化合物の具体的構造 □：親和性物質(A) ⬚：切断性部分(L中) ○：生体直交性官能基 B(a)またはL(ii) ⬚：反応性基(R)	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可溶性タンパク質（抗体）*
59	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
60	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
61	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	
62	 上記アミノ酸配列：配列番号５１	

[0990]

[表7]

表７．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可溶性タンパク質（抗体）との関係（その３）

実施例	化合物の具体的構造 □：親和性物質(A) ⬚：切断性部分(L中) ○：生体直交性官能基 B(a)またはL(ii) ⬚：反応性基(R)	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可溶性タンパク質（抗体）*
63	 上 記アミノ酸配列：配列番号５１	

[0991] 以上より、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

[0992] 本発明は、例えば、位置選択的に修飾された可溶性タンパク質の製造に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（Ｉ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ （Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩。

[請求項2] 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、請求項１記載の化合物またはその塩。

[請求項3] Ｌが前記（ｉ）の切断性リンカーである、請求項２記載の化合物またはその塩。

[請求項4] 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、請求項２または３記載の化合物またはその塩。

[請求項5] Ｌが前記（ｉｉ）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、請求項２記載の化合物またはその塩。

[請求項6] 可溶性タンパク質に対する親和性物質がペプチドである、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] ペプチドが、モノクローナル抗体のＦｃ領域に対する結合性ペプチドである、請求項６記載の化合物またはその塩。

[請求項8] 結合性ペプチドが、ＩｇＧのＦｃ領域に対する結合性ペプチドである、請求項７記載の化合物またはその塩。

[請求項9] 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、請求項１～８のいずれか一項記載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。

[請求項10] 結合性ペプチドが、下記式（ｉ）：

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９４）　（ｉ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ

Ｗは、トリプトファン残基である。〕

によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を

含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、請求項７～９のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項11] 結合性ペプチドが、下記式（ｉ－１）：

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９５）　（ｉ－１）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、又はジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇはグリシン残基であり、

Ｘａａ２はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、

Ｌはロイシン残基であり、

Ｖはバリン残基であり、かつ

Ｗはトリプトファン残基である。〕

によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、請求項７～９のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項12] 結合性ペプチドが、下記式（ｉ－２）：

（X_{1-3}）－Ｃ－（X_{2}）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（X_{1-3}）　（配列番号９６）　（ｉ－２）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基

であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、グルタミン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、かつ、

Ｗは、トリプトファン残基である。〕によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、請求項７～１０のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項13] 結合性ペプチドが、下記式（ｖ）：

（X_{1-3}）－Ｃ－（Ｘａａ３）－（ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）　（配列番号１０２）　（ｖ）

〔式中、

Ｘは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕によって表される、１３～１７アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であるペプチドまたはその塩である、請求項７～１２のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項14] 結合性ペプチドは、下記式（ｖｉ）：

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）　（配列番号１０３）　（ｖｉ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、１３～１５アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、請求項７～１３のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項15] 結合性ペプチドが、下記式（ｖｉｉ）：

Ｄ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－Ｔ （配列番号１０４） （ｖｉｉ）

〔式中、

Ｄは、アスパラギン酸残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、かつ

Ｔは、スレオニン残基である〕で表される、１３アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、請求項７～１４のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項16] 結合性ペプチドが、下記式（ｖｉｉｉ）：

Ｒ－Ｇ－Ｎ－Ｃ－（Ｘａａ３）－（Ｘａａ４）－Ｈ－（Ｘａａ１）－Ｇ－（Ｘａａ２）－Ｌ－Ｖ－Ｗ－Ｃ－（Ｘａａ５）－（Ｘａａ６）－（Ｘａａ７）　（配列番号１０５）　（ｖｉｉｉ）

〔式中、

Ｒは、アルギニン残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｎは、アスパラギン残基であり、

Ｃは、システイン残基であり、

Ｘａａ３は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ４は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Ｈは、ヒスチジン残基であり、

Ｘａａ１は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Ｇは、グリシン残基であり、

Ｘａａ２は、リジン残基、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り、

Ｌは、ロイシン残基であり、

Ｖは、バリン残基であり、

Ｗは、トリプトファン残基であり、

Ｘａａ５は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Ｘａａ６は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Ｘａａ７は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕

で表される、１３～１５アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、請求項７～１３のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項17] 結合性ペプチドが、ヒトＩｇＧと結合可能であることを特徴とする、請求項７～１６のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項18] 結合性ペプチドが、（ａ）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＲＤＤＣ（配列番号９２）のアミノ酸配列において、いずれかのアミノ酸残基が、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、２－アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基からなる群より選ばれる１つのアミノ酸残基により置換されており、かつ

（ｂ）配列番号９２の前記アミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、親和性ペプチドまたはその塩である、請求項７～９のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項19] 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、請求項１～１８のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項20] 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

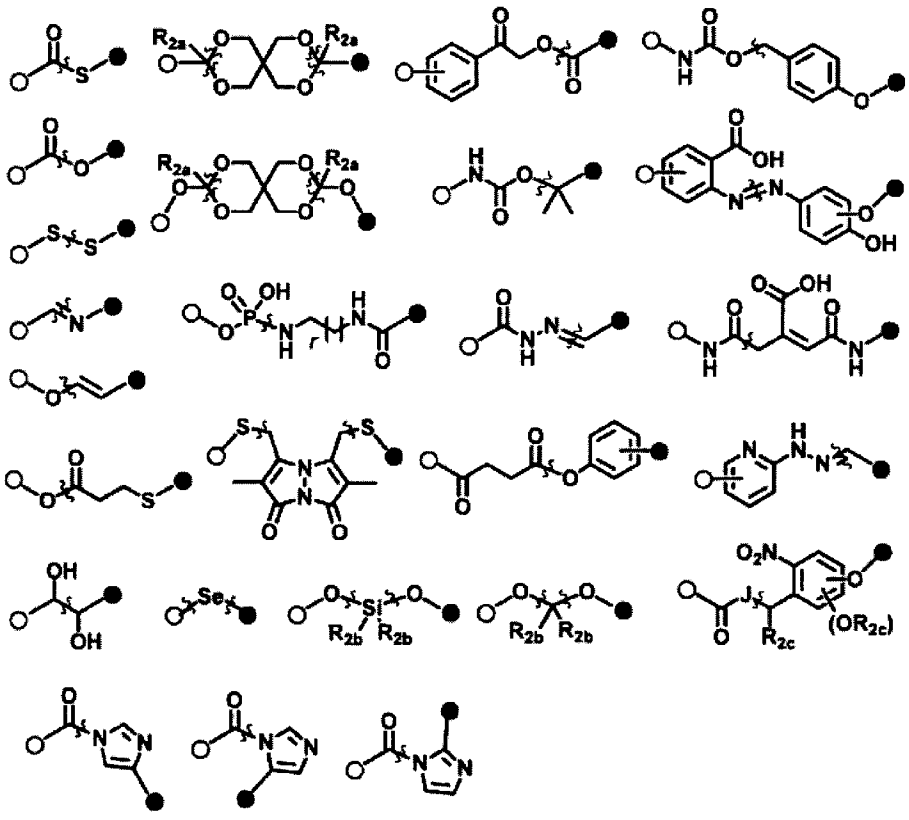
る、請求項１～１９のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項21] 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２～２０のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項22] 前記（ｉｉ）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２～２０のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項23] 切断性部分が、下記：

[化1]



〔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、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（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。）；

（ｖｉ）NR_dR_e-、$NR_dR_e-C(=O)-$、$NR_dR_e-C(=O)-O-$、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。）；または

（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

からなる群より選ばれ、

Ｊは、$-CH_2-$、－Ｏ－、または－Ｓ－であり、

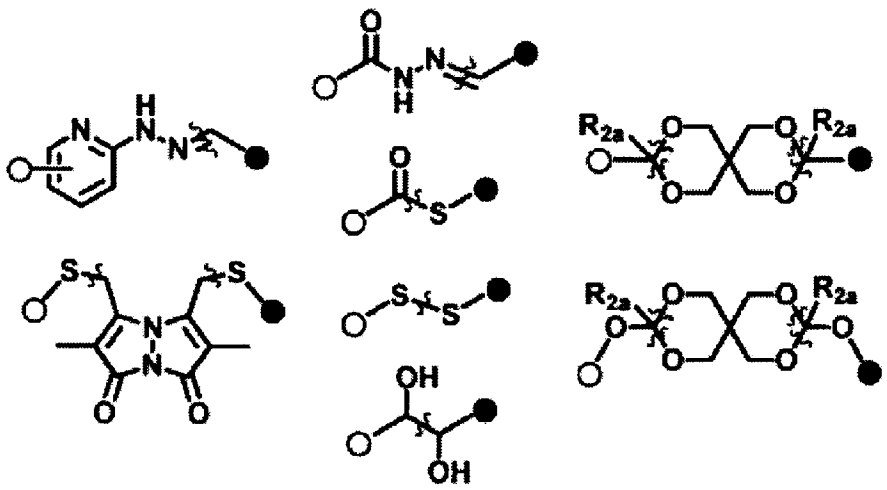
ｒは、１～４の任意の整数であり、

○（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、●がＡに対する結合を示し、○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、請求項１～２０のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項24] 前記（ｉ）の切断性部分が、以下：

[化2]



〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

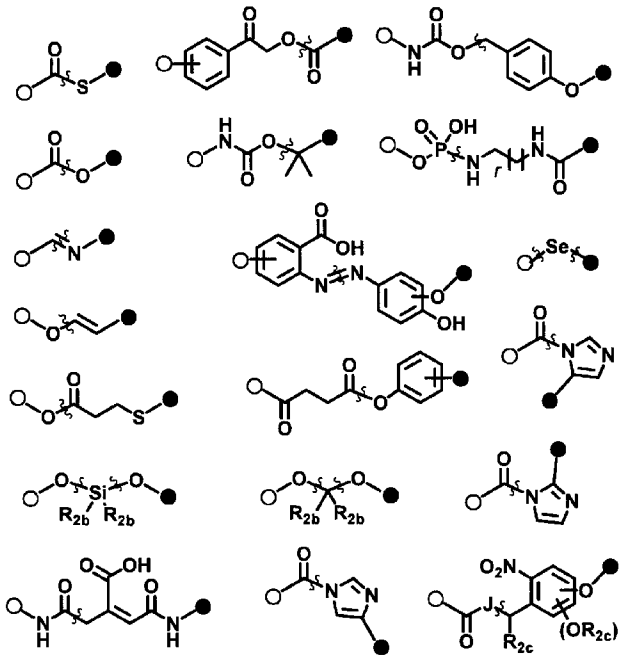
R_{2a}は、請求項２３と同じであり、

〇（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、●がＡに対する結合を示し、〇が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、請求項２～１９、２１、２３のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項25] 前記（ｉｉ）の切断性部分が、以下：

[化3]



〔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、請求項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、●がＡに対する結合を示し、○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、請求項２～１９、２２、２３のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項26] Ｌが、下記式（Ｌ１）～（Ｌ３）：

Ｌａ－Ｃ－Ｌｂ （Ｌ１）

Ｌａ－Ｃ （Ｌ２）

Ｃ－Ｌｂ （Ｌ３）

〔式中、

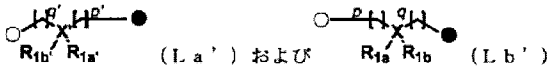
ＬａおよびＬｂは、それぞれ、２価の基であり、

Ｃは、切断性部分である。〕のいずれか一つで表される、請求項１

～２５のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項27] 前記ＬａおよびＬｂが、それぞれ、下記（Ｌａ’）および（Ｌｂ’）：

[化4]



（Ｌａ’）および （Ｌｂ’）

〔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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

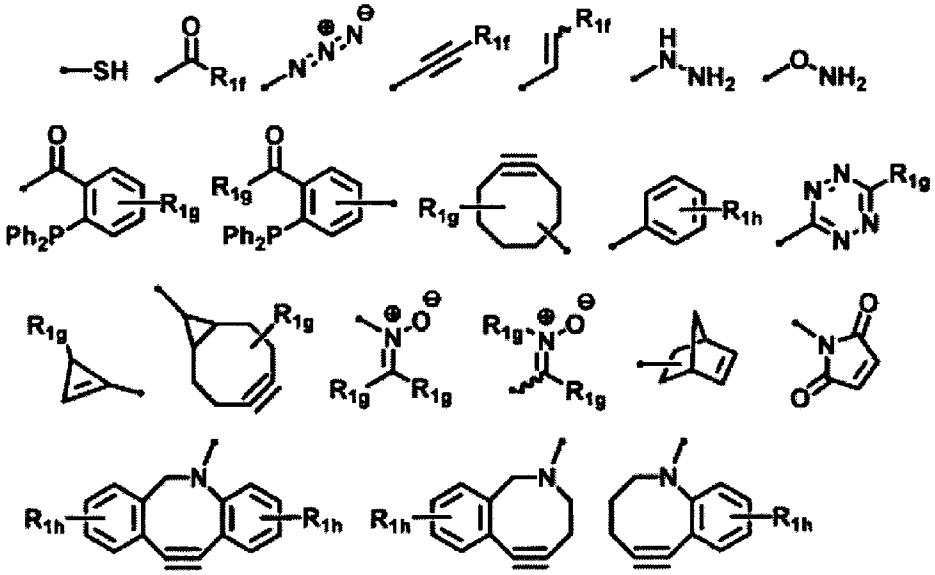
R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は、同一または異なって、前記（ｉ）～（ｖｉｉ）からなる群より選ばれる原子または基である。〕で表される、請求項２６記載の化合物またはその塩。

[請求項28] 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、チオエステル基、α－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、請求項１～２７のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項29] 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、α－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、請求項１～２７のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項30] 生体直交性官能基が、下記：

[化5]



〔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。）で表されるいずれか一つである、請求項１～２９のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項31] 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$_a$－（Ｒ$_a$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、請求項１～３０のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項32] Ｂが、下記式（Ｂ－１）：

[化6]

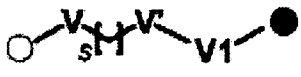


（Ｂ－１）

〔式中、

Ｙは、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または下記式（Ｂ－２）：

[化7]



（Ｂ－２）

（式中、

ＶおよびＶ’は、同一または異なって、－ＮＨ－、－Ｏ－、－ＣＨ$_2$－、または単結合であり、

Ｖ１は、生体直交性官能基を含む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$_2$－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、請求項１～３１のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

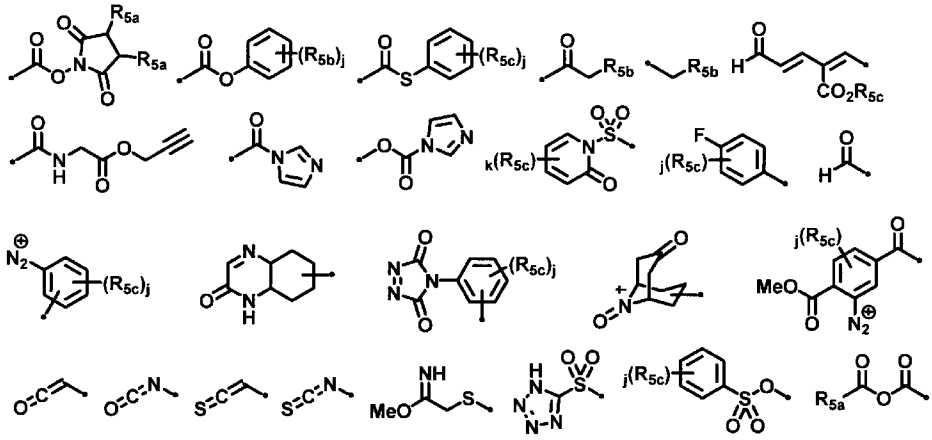
[請求項33] 反応性基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残

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、請求項１～３２のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項34] 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、請求項３３記載の化合物またはその塩。

[請求項35] 反応性基が、下記：

[化8]



〔ここで、

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

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。〕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１～３４のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項36] ＡおよびＲを連結する主鎖の原子数が４～２０個である、請求項１～３５のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項37] ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、請求項１～３６のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項38] 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１～３７のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項39] 前記式（Ｉ）で表される化合物が、下記（Ｉ’）：

Ａ－Ｂ２－Ｌ’－Ｂ１－Ｒ （Ｉ’）

〔式中、

ＡおよびＲは、前記式（Ｉ）のものと同じであり

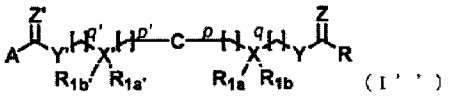
Ｌ’は、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーであり、

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。〕で表される化合物である、請求項１～３８のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

[請求項40] 前記式（Ｉ’）で表される化合物が、下記（Ｉ’’）：

[化9]



（Ｉ’’）

〔式中、

ＡおよびＲは、請求項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’、R_{1a}、$R_{1a'}$、R_{1b}、および$R_{1b'}$は、請求項２７記載の式（Ｌａ’）および（Ｌｂ’）のものと同じであり、

ＹおよびＹ’は、同一または異なって、請求項３２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、請求項３９記載の化合物またはその塩。

[請求項41] 下記式（Ｉ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ （Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬。

[請求項42] 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。

[請求項43] 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む、抗体の位置選択的修飾試薬。

[請求項44] 下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ （ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項45] 可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、請求項４４記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項46] 可溶性タンパク質がＩｇＧ抗体である、請求項４４または４５記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項47] 可溶性タンパク質がヒト由来である、請求項４４～４６のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項48] 可溶性タンパク質が、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抗体である、請求項４４～４７のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩：

（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。

[請求項49] 可溶性タンパク質が、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４４～４８のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項50] 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４９記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項51] 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５０記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項52] 前記標的領域が、（ａ）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、（ｂ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における２８８～２９０位のアミノ酸残基からなる領域、または（ｃ）ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域における３１７位のアミノ酸残基からなる領域である、請求項５１記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項53] 前記位置選択性が５０％以上である、請求項４９～５２のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項54] 前記位置選択性が７０％以上である、請求項５３記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項55] 前記位置選択性が９０％以上である、請求項５４記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項56] 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、請求項４９～５５のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項57] 前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

Ｔが、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、Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がＡ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位を複数個有する、請求項４４～５６のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項58] 前記可溶性タンパク質が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

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、請求項４４～５７のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

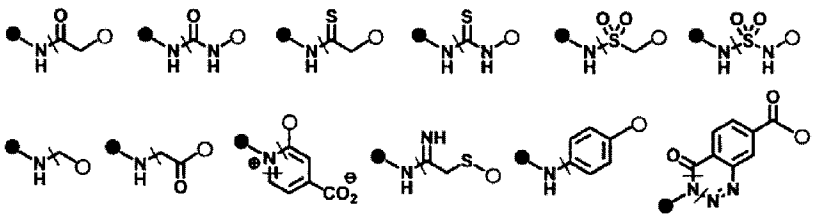
[請求項59] 重鎖の個数が２個である、請求項５８記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項60] 可溶性タンパク質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、請求項４４～５９のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項61] 可溶性タンパク質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、請求項４４～６０のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項62] 前記反応により生成する部分が、下記：

[化10]



〔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、請求項４４～６１のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項63] ＡおよびＲ’を連結する主鎖の原子数が４～２０個である、請求項４４～６２のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項64] ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、請求項４４～６３のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項65] 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４４～６４のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項66] 前記式（ＩＩ）で表される化合物が、下記（ＩＩ’）：

Ａ－Ｂ２－Ｌ’－Ｂ１－Ｒ’－Ｔ （ＩＩ’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’およびＴは、前記式（ＩＩ）のものと同じであり

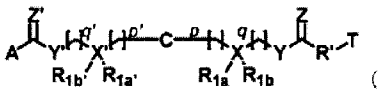
Ｌ’は、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーであり、

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。〕で表される化合物である、請求項４４～６５のいずれか一項記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項67] 前記式（ＩＩ’）で表される化合物が、下記（ＩＩ’’）：

[化11]



（ＩＩ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’およびＴは、請求項４４記載の式（ＩＩ）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、０～１０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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は、同一または異なって、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（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。）；

（ｖｉ）NR_dR_e－、NR_dR_e－Ｃ（＝Ｏ）－、NR_dR_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。）；または

（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

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、請求項３２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、請求項３２記載の式（Ｂ－１）のＺと同じである。〕で表される、請求項６６記載の可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項68] 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、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、

Ｔは、抗体である。〕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。

[請求項69] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（Ｉ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ （Ｉ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項70] 可溶性タンパク質が抗体であり、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、請求項６９記載の方法。

[請求項71] 下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩。

[請求項72] 可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、請求項７１記載の複合体またはその塩。

[請求項73] 可溶性タンパク質がＩｇＧ抗体である、請求項７１または７２記載の複合体またはその塩。

[請求項74] 可溶性タンパク質がヒト由来である、請求項７１～７３のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項75] 可溶性タンパク質が、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抗体である、請求項７１～７４のいずれか一項記載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。

[請求項76] 可溶性タンパク質が、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’（－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３０％以上の位置選択性で結合している、請求項７１～７５のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項77] 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、請求項７６記載の複合体またはその塩。

[請求項78] 前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

Ｔが、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、Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位を複数個有する、請求項７１～７７のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

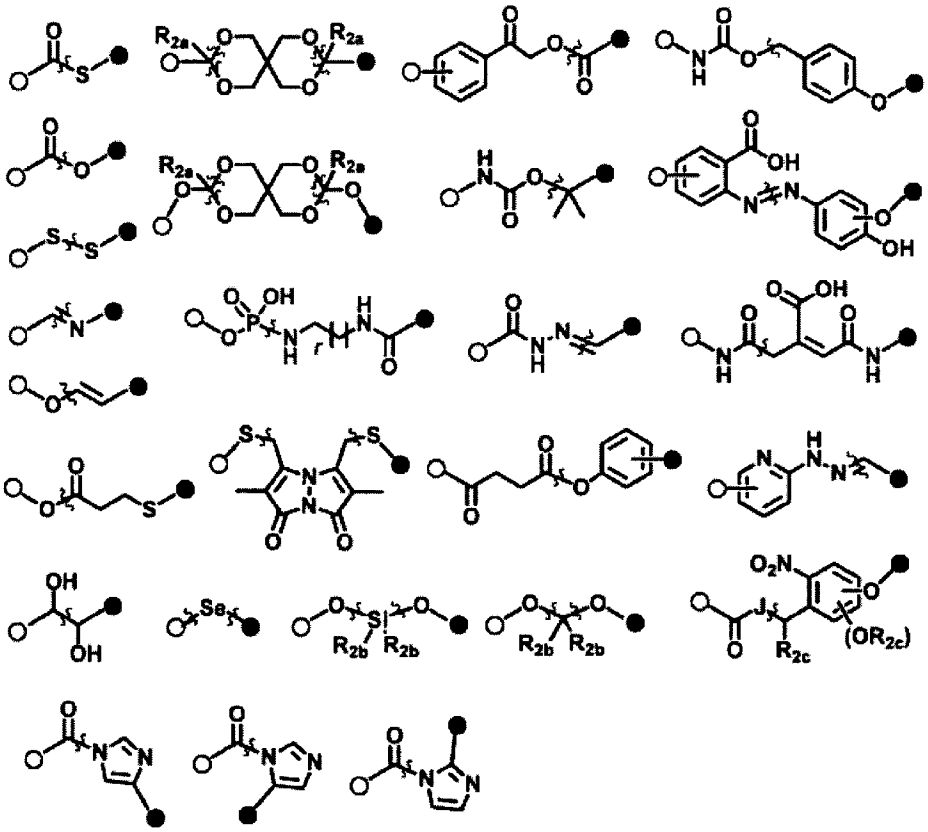
[請求項79] 前記可溶性タンパク質が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

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、請求項７１～７８のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項80] 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反応部分を含む２価の基である、請求項７１～７９のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項81] 前記反応により生成する部分が、下記：

[化12]



〔ここで、結合に直交する波線は、反応により生成する結合を示し、

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、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（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。）；

（ｖｉ）NR_dR_e-、$NR_dR_e-C(=O)-$、$NR_dR_e-C(=O)-O-$、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。）；または

（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

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、

〇（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。

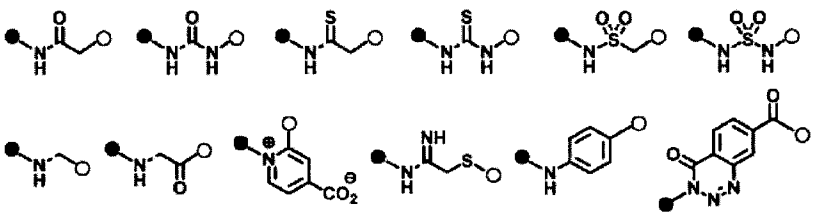
化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がＡに対する結合を示し、〇がＢに対する結合を示していてもよい。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、請求項７１～８０のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項82] 可溶性タンパク質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、請求項７１～８１のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項83] 可溶性タンパク質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、請求項７１～８２のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項84] 前記反応により生成する部分が、下記：

[化13]



〔ここで、●（黒丸）は、Ｔ側の部分に対する結合を示し、〇（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、請求項７１～８３のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項85] 機能性物質が薬物または標識物質である、請求項７１～８４のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項86] 機能性物質が低分子化合物である、請求項７１～８５のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項87] 薬物が抗癌剤である、請求項８５または８６記載の複合体またはその塩。

[請求項88] ＡおよびＲ’を連結する主鎖の原子数が４～２０個である、請求項７１～８７のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項89] ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、請求項７１～８８のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項90] 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７１～８９のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項91] 前記式（ＩＩＩ）で表される化合物が、下記式（ＩＩＩ’）：

Ａ－Ｂ２’（－Ｆ２）－Ｌ’－Ｂ１’（－Ｆ１）－Ｒ’－Ｔ （ＩＩＩ’）

〔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、

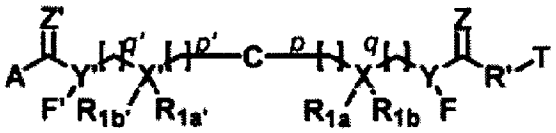
Ｂ１’およびＢ２’は、同一または異なって、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む２価の基であり、

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。〕で表される、請求項７１～９０のいずれか一項記載の複合体またはその塩。

[請求項92] 前記式（ＩＩＩ’）で表される化合物が、下記（ＩＩＩ’’）：

[化14]



（ＩＩＩ’’）

〔式中、

Ａ、Ｒ’およびＴは、請求項７１記載の式（ＩＩＩ）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、０～１０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、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は存在しない）であり、

R_{1a}、R_{1b}、$R_{1a'}$および$R_{1b'}$は、同一または異なって、前記（ｉ）～（ｖｉｉ）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、請求項３２記載の式（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、請求項９１記載の複合体またはその塩。

[請求項93] 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２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、

Ｔは、抗体である。〕で表される、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。

[請求項94] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａ、Ｌ、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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項95] 可溶性タンパク質が抗体であり、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、請求項９４記載の方法。

[請求項96] 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合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、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ （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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて

、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項97]　生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項98] 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、請求項９７記載の方法。

[請求項99] 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、請求項９８記載の方法。

[請求項100] 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、請求項９８または９９記載の方法。

[請求項101] 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、請求項９８記載の方法。

[請求項102] 可溶性タンパク質が抗体であり、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、請求項９７～１０１のいずれか一項記載の方法。

[請求項103] 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒは、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項104]　機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、あるいは

下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項105] 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ （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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、請求項１０４記載の方法。

[請求項106] 前記生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を、１種または２種の機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ２）：

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ （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）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、請求項１０４記載の方法。

[請求項107] 可溶性タンパク質が抗体であり、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、請求項１０４～１０６のいずれか一項記載の方法。

[請求項108] 機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

（Ａ）下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質ま

たはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａ、Ｌ、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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項109]　機能性物質を有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、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またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質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）：

Ｌ１－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項110] 機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

（Ａ）下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を、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）

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項111]　機能性物質を有する可溶性タンパク質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、

Ａは、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒは、前記可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式（ＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

（Ｂ）前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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可溶性タンパク質またはその塩を、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）

Ｆ－Ｌ１’－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（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）：

Ｆａ－Ｌ１’－Ｂ’（－Ｆｂ）－Ｒ’－Ｔ　　（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２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可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項112] 生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、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、かつ

生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項113] 下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項114] 生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質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（ａ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＬ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質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可溶性タンパク質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、かつ

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

[請求項115] 機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、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、かつ

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項116] 下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつ

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

[請求項117] 機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（ＩＩＩ）：

Ａ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＩＩ）

〔式中、

Ａは、可溶性タンパク質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２価の基であり、

Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’は、可溶性タンパク質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、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、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。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、あるいは

下記式（ＩＶ）：

Ｌ１－Ｂ－Ｒ’－Ｔ　　（ＩＶ）

〔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、（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、可溶性タンパク質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、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個以上含む可溶性タンパク質である。〕で表され、かつＡ－Ｌ－Ｂ’（－Ｆ）－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、

下記式（Ｖ）：

Ｆ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’－Ｔ　　（Ｖ）

〔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、

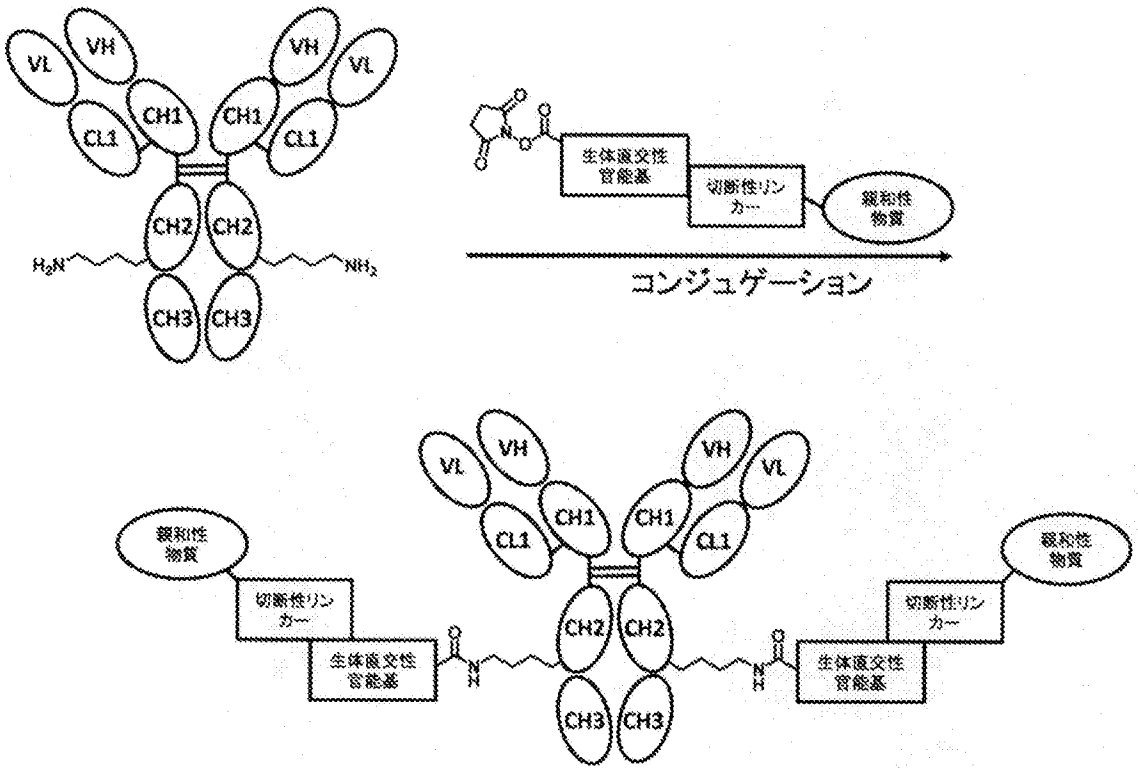
Ｂは、（ａ）生体直交性官能基を含む２価の基、または（ｂ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

（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、

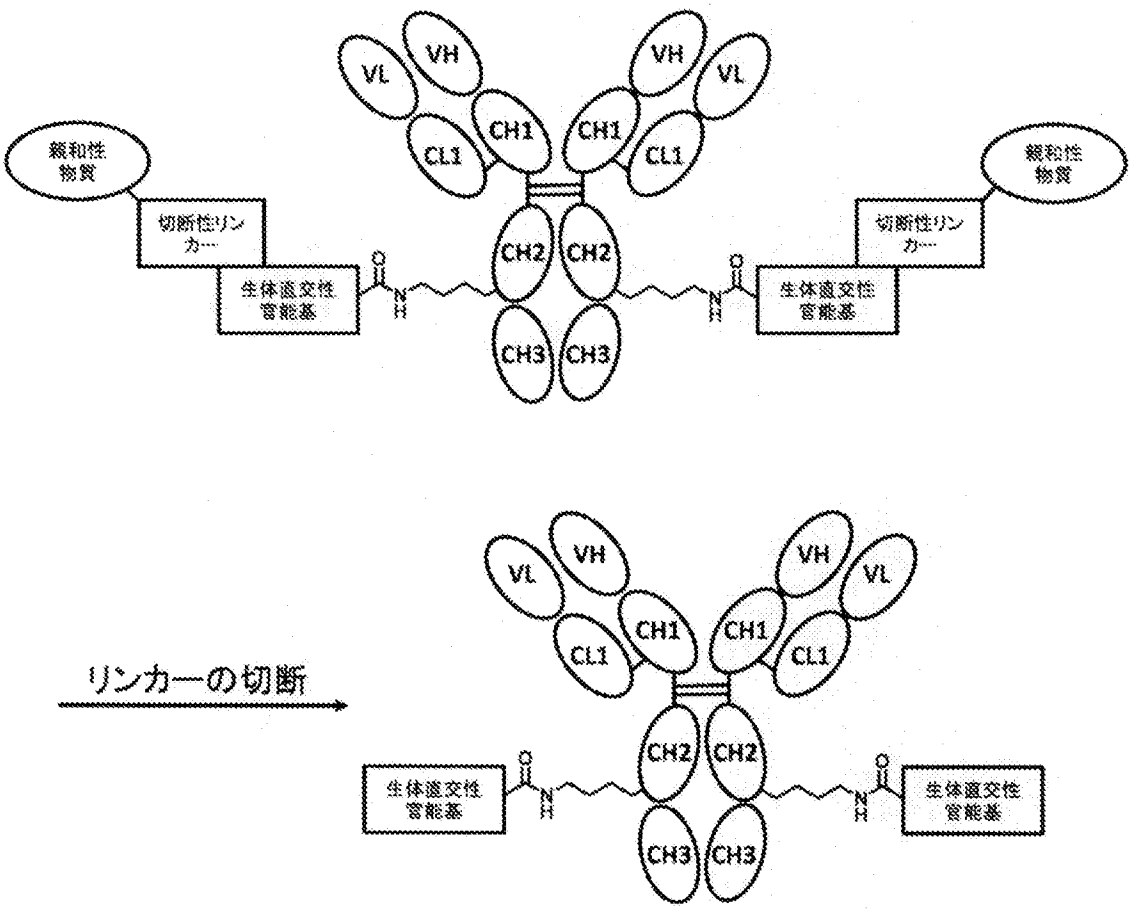
Ｆは、機能性物質であり、

Ｒ’およびＴは、前記式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のものと同じである。〕で表され、かつＦ－（Ｌ１－Ｂ）’－Ｒ’で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の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、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

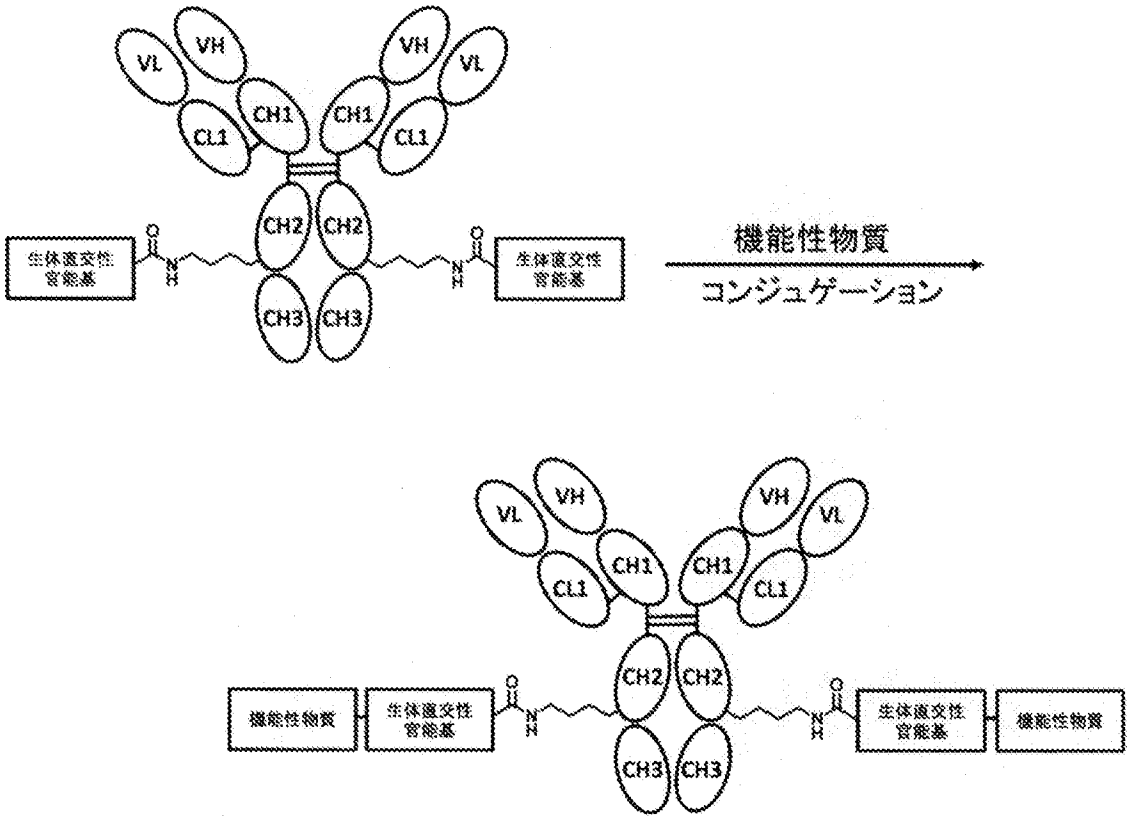
[図1-1]


VL
VH
VH
VL
CL1
CH1
CH1
CL1
CH2
CH2
H_2N
NH_2
CH3
CH3
生体直交性官能基
切断性リンカー
親和性物質
コンジュゲーション
VL
VH
VH
VL
CL1
CH1
CH1
CL1
親和性物質
切断性リンカー
生体直交性官能基
CH2
CH2
CH3
CH3
N
H
N
H
生体直交性官能基
切断性リンカー
親和性物質

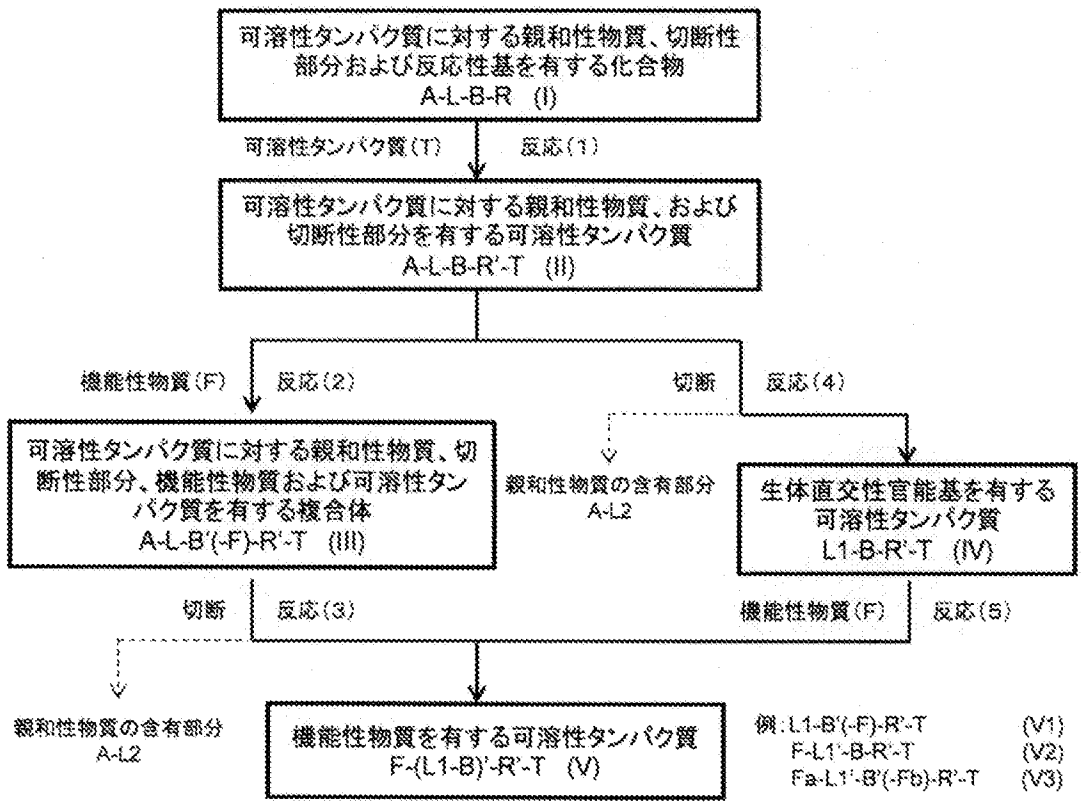
[図1-2]



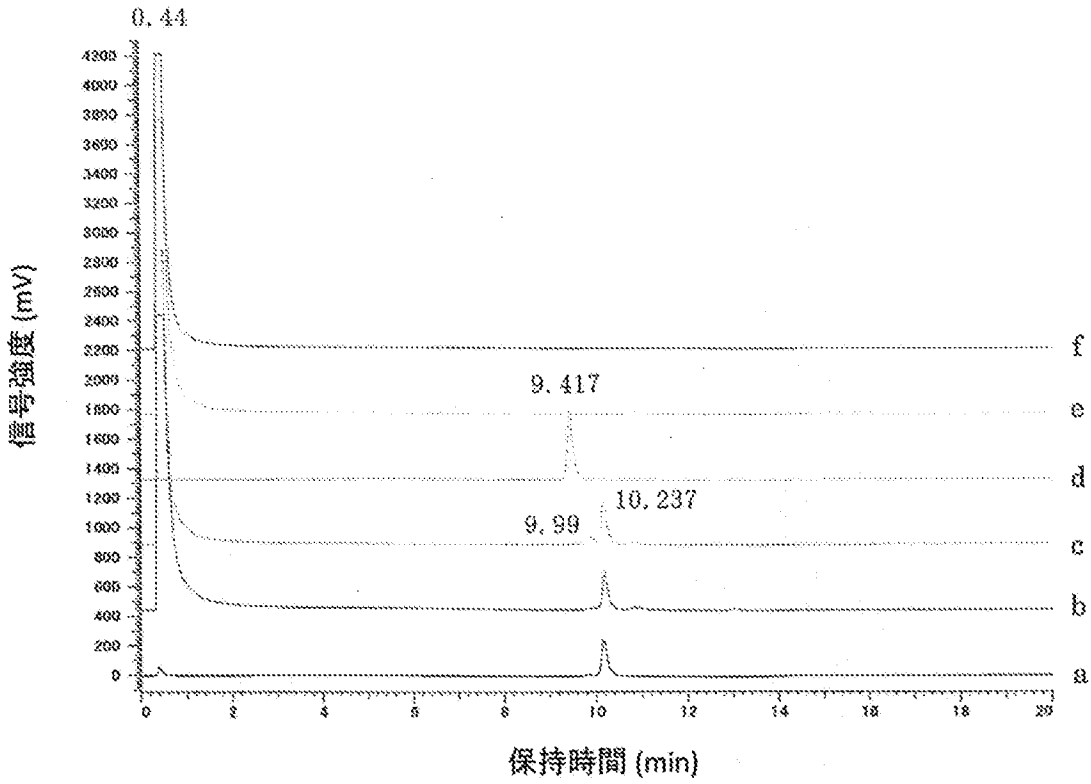
[図1-3]


VL
VH
VH
VL
CL1
CH1
CH1
CL1
CH2
CH2
生体適合性官能基
生体適合性官能基
CH3
CH3
機能性物質
コンジュゲーション
機能性物質
生体適合性官能基
生体適合性官能基
機能性物質

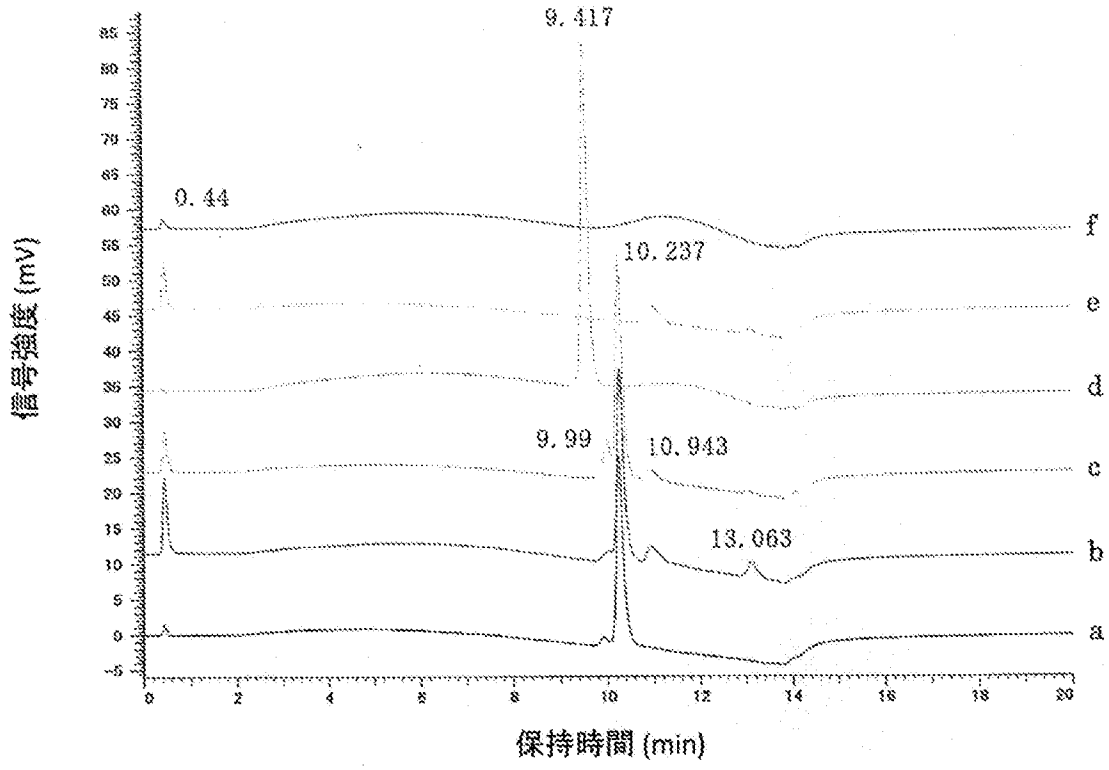
[図2]


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
A-L-B-R (I)
可溶性タンパク質(T)
反応(1)
可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質
A-L-B-R'-T (II)
機能性物質(F)
反応(2)
切断
反応(4)
可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体
A-L-B'(-F)-R'-T (III)
親和性物質の含有部分
A-L2
生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質
L1-B-R'-T (IV)
切断
反応(3)
機能性物質(F)
反応(5)
親和性物質の含有部分
A-L2
機能性物質を有する可溶性タンパク質
F-(L1-B)'-R'-T (V)
例:L1-B'(-F)-R'-T (V1)
F-L1'-B-R'-T (V2)
Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

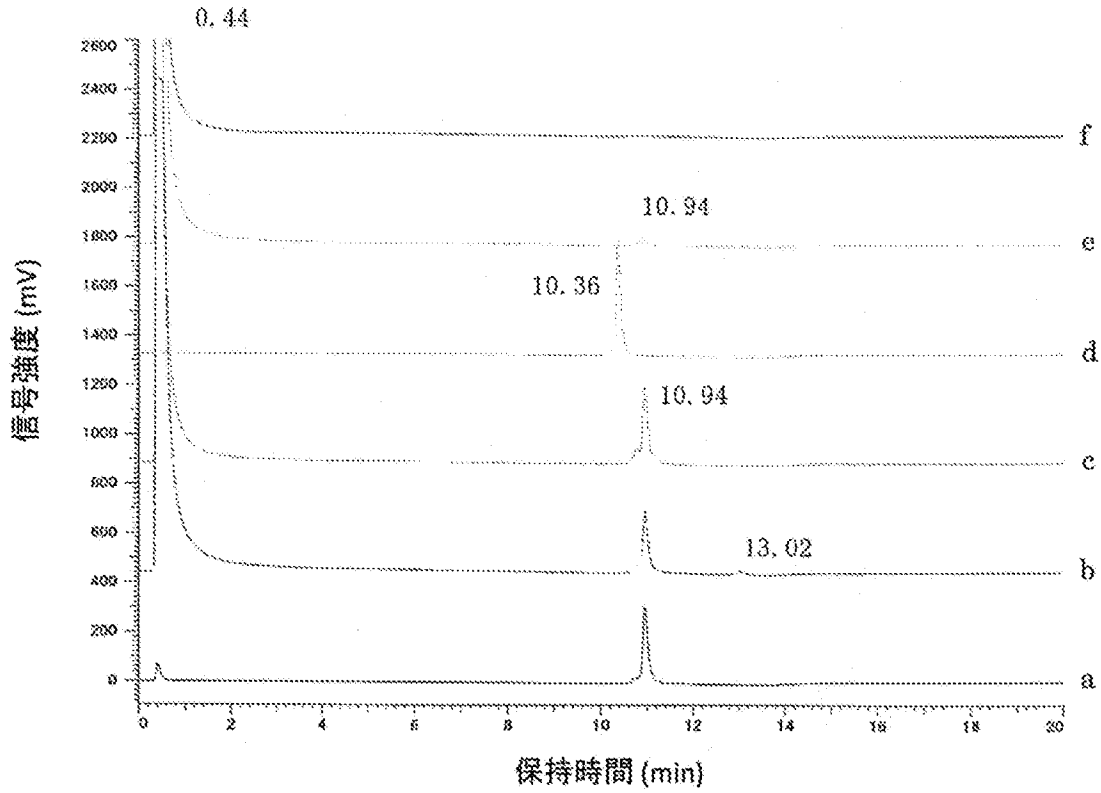
[図3]



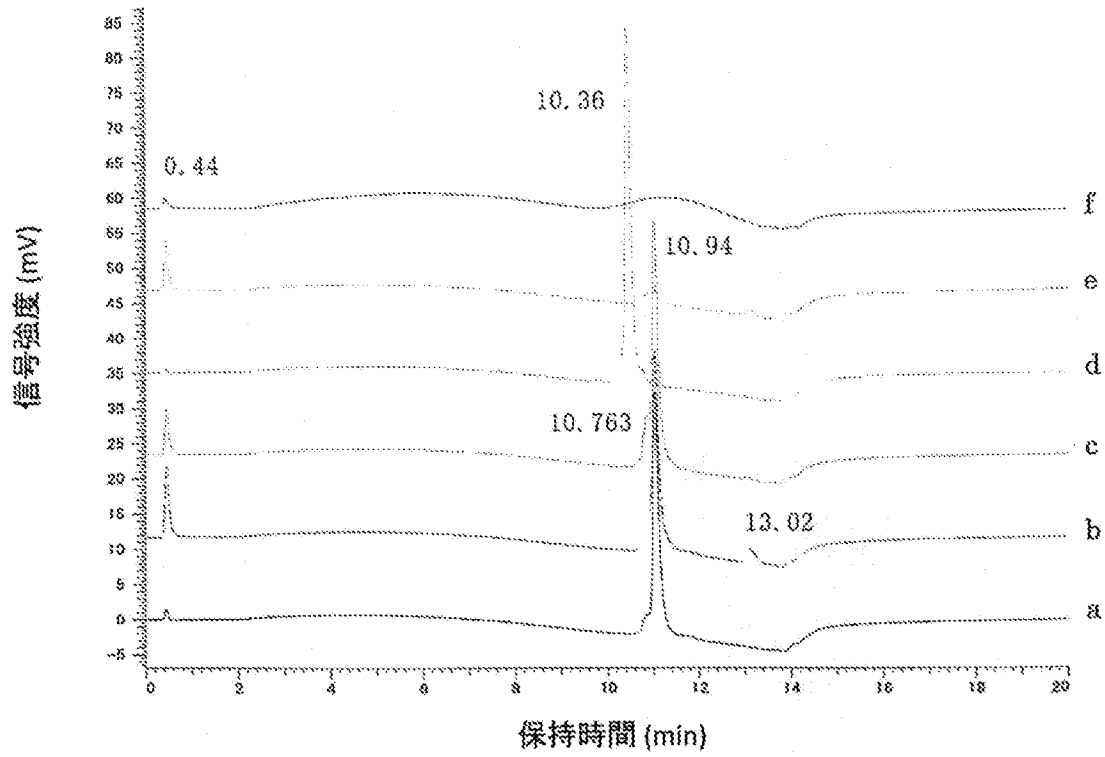
[図4]



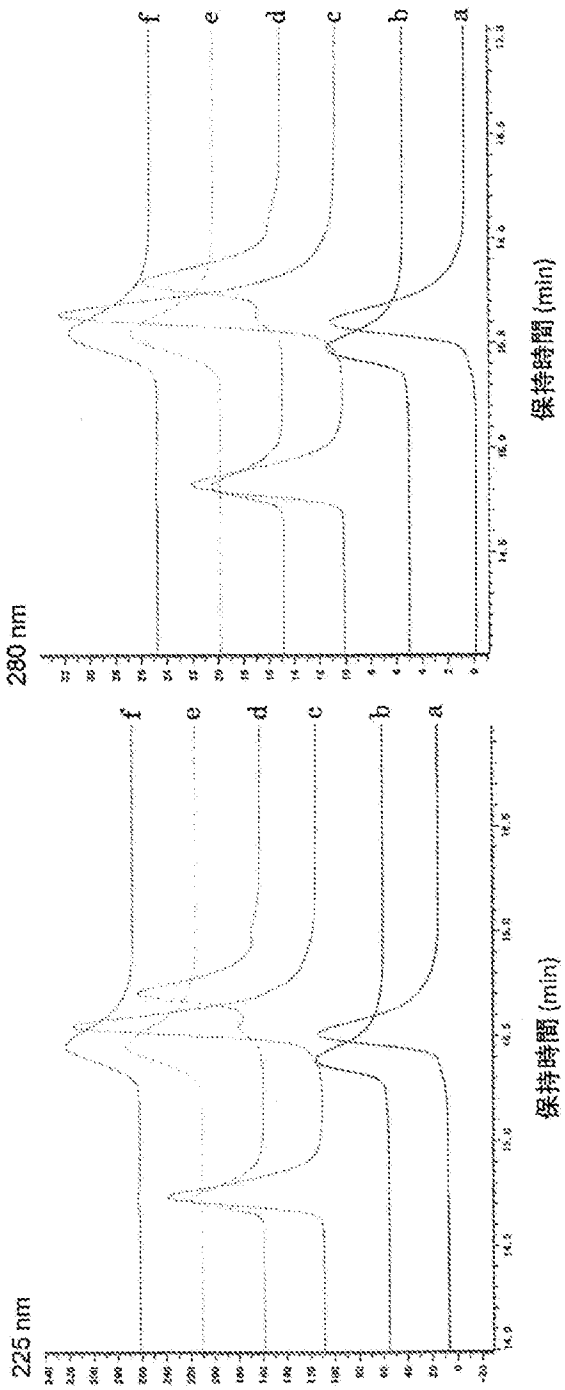
[図5]



[図6]



[図7]



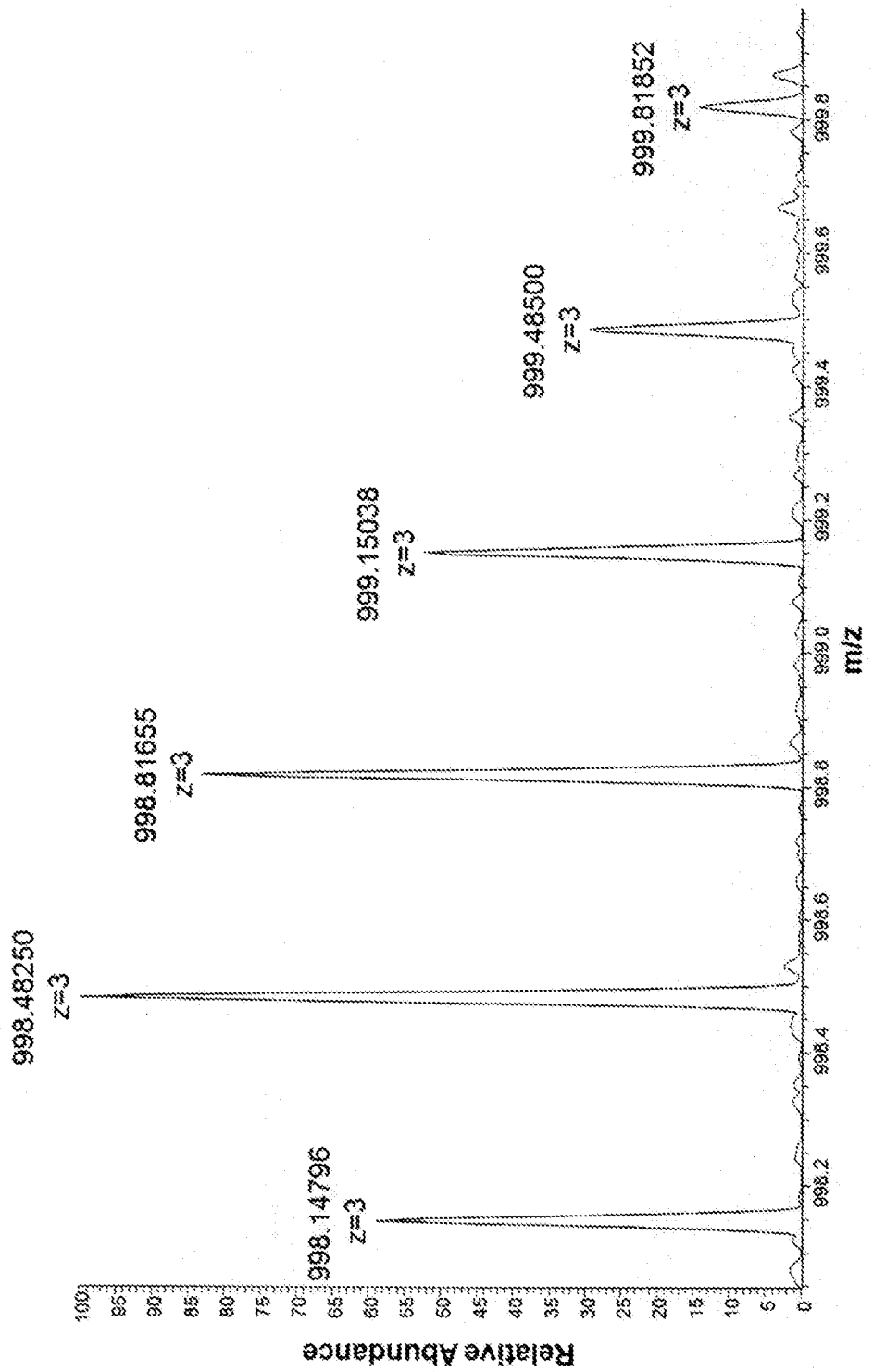
[図8]

（1）糖鎖をＰＮＧａｓｅで切断したトラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＮＩＫＤＴＹＩＨＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＹＰＴＮＧＹＴＲＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＳＲＷＧＧＤＧＦＹＡＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ
ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ
ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴ
ＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧ
ＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷ
ＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＤＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫ
ＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥ
ＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶ
ＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴ
ＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（配列番号２）

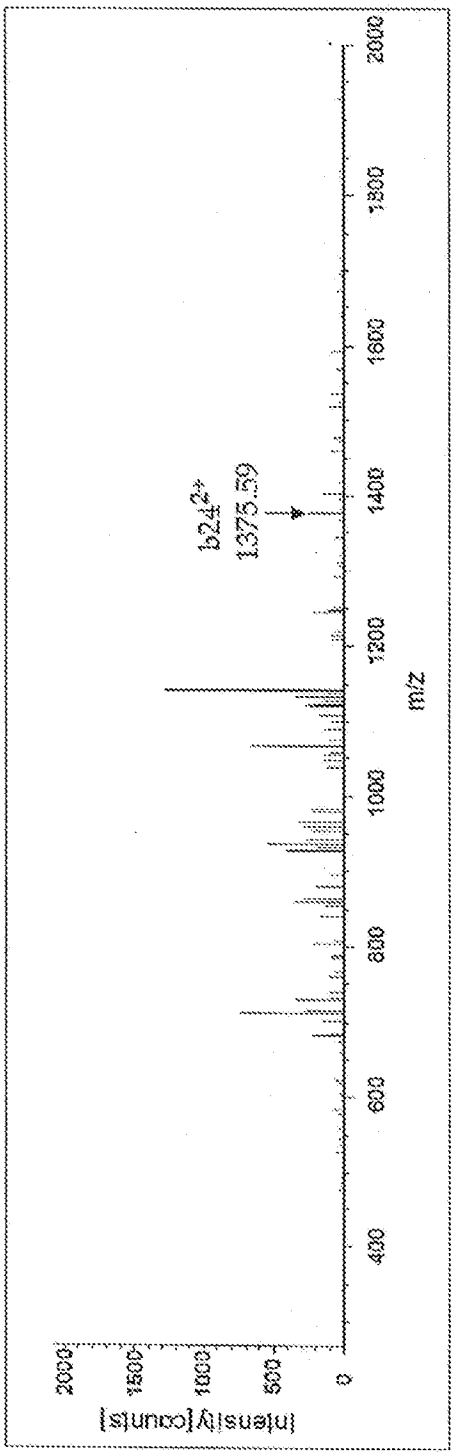
（２）糖鎖をＰＮＧａｓｅで切断したＩｇＧ１　Ｆｃ領域のアミノ酸配列
ＩＥＧＲＭＤＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＥＧＡＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴ
ＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫ
ＰＲＥＥＱＹＤＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡ
ＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫ
ＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＡＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬ
ＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列
番号３）

（３）トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＶＮＴＡＶＡＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＳＡＳＦＬＹＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＲＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＨＹＴＴＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号４）

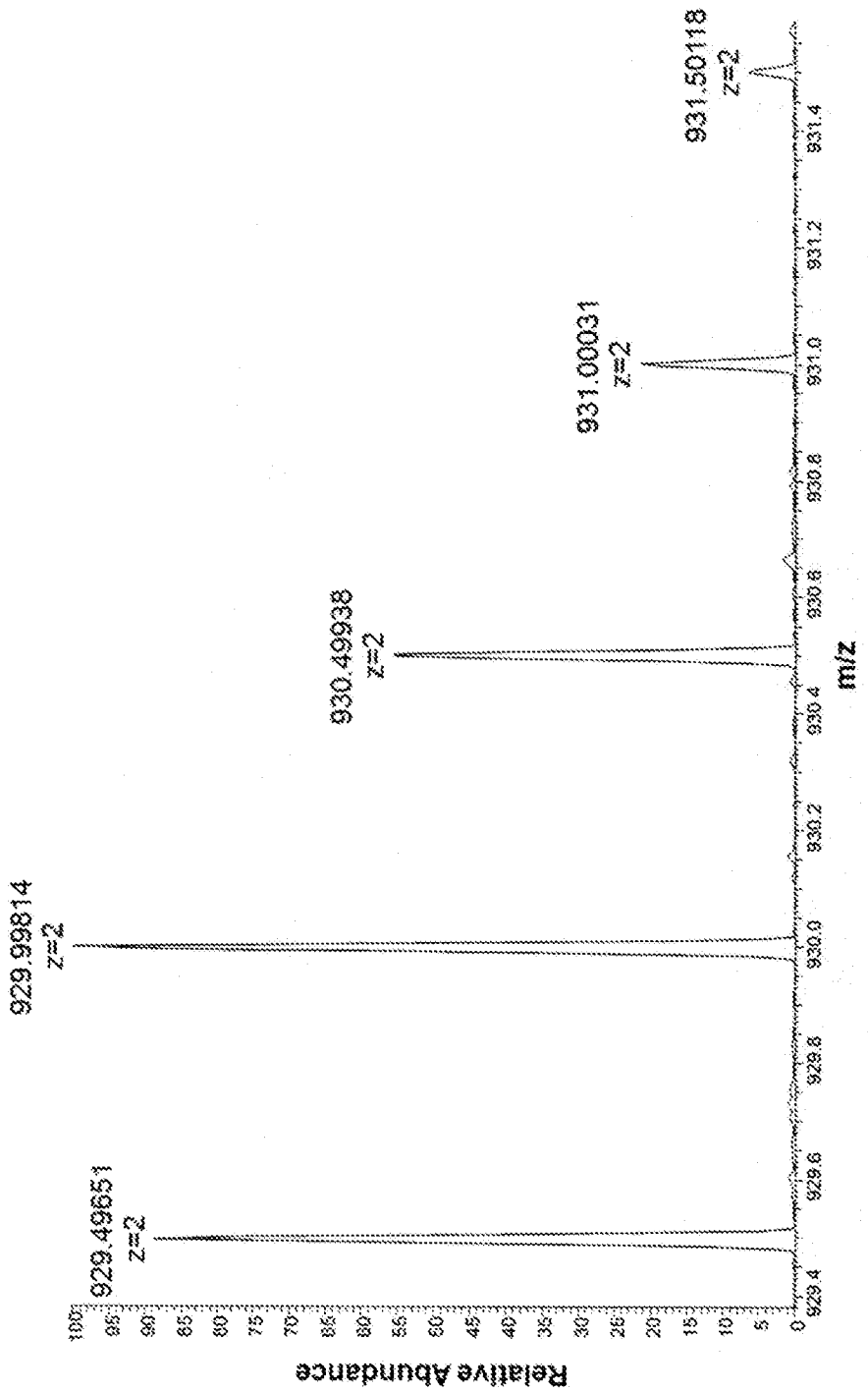
[図9]


998.48250
z=3
998.81655
z=3
999.15038
z=3
999.48500
z=3
999.81852
z=3
998.14796
z=3
Relative Abundance
m/z

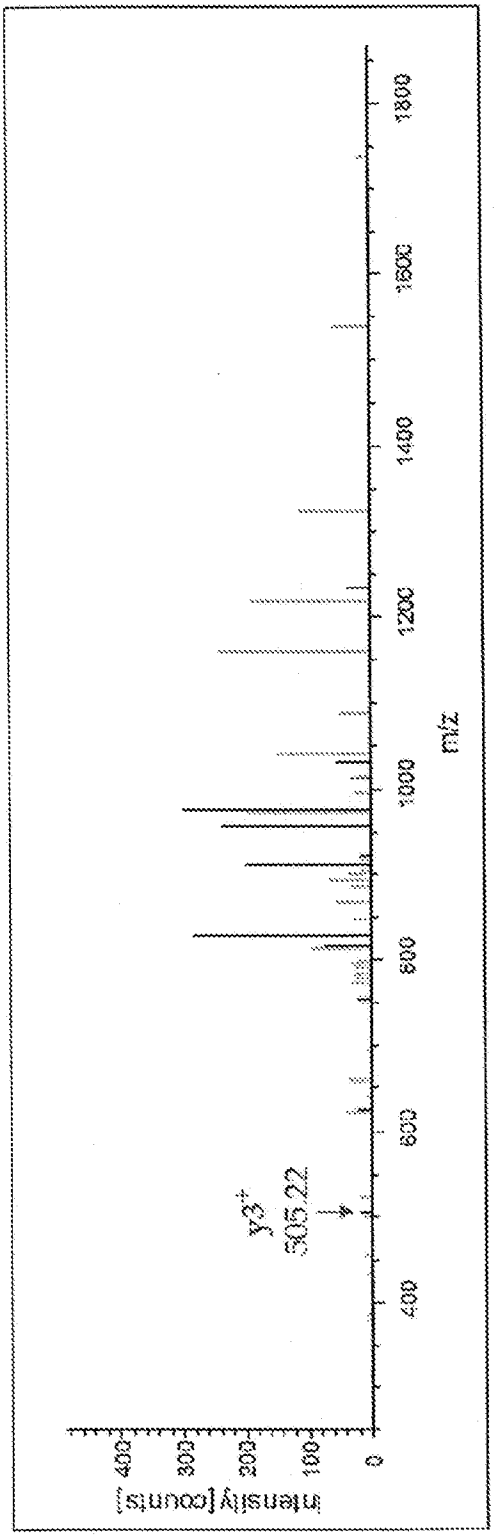
[図10]


b24 2+
1375.59
m/z
Intensity[counts]
0
500
1000
1500
2000
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

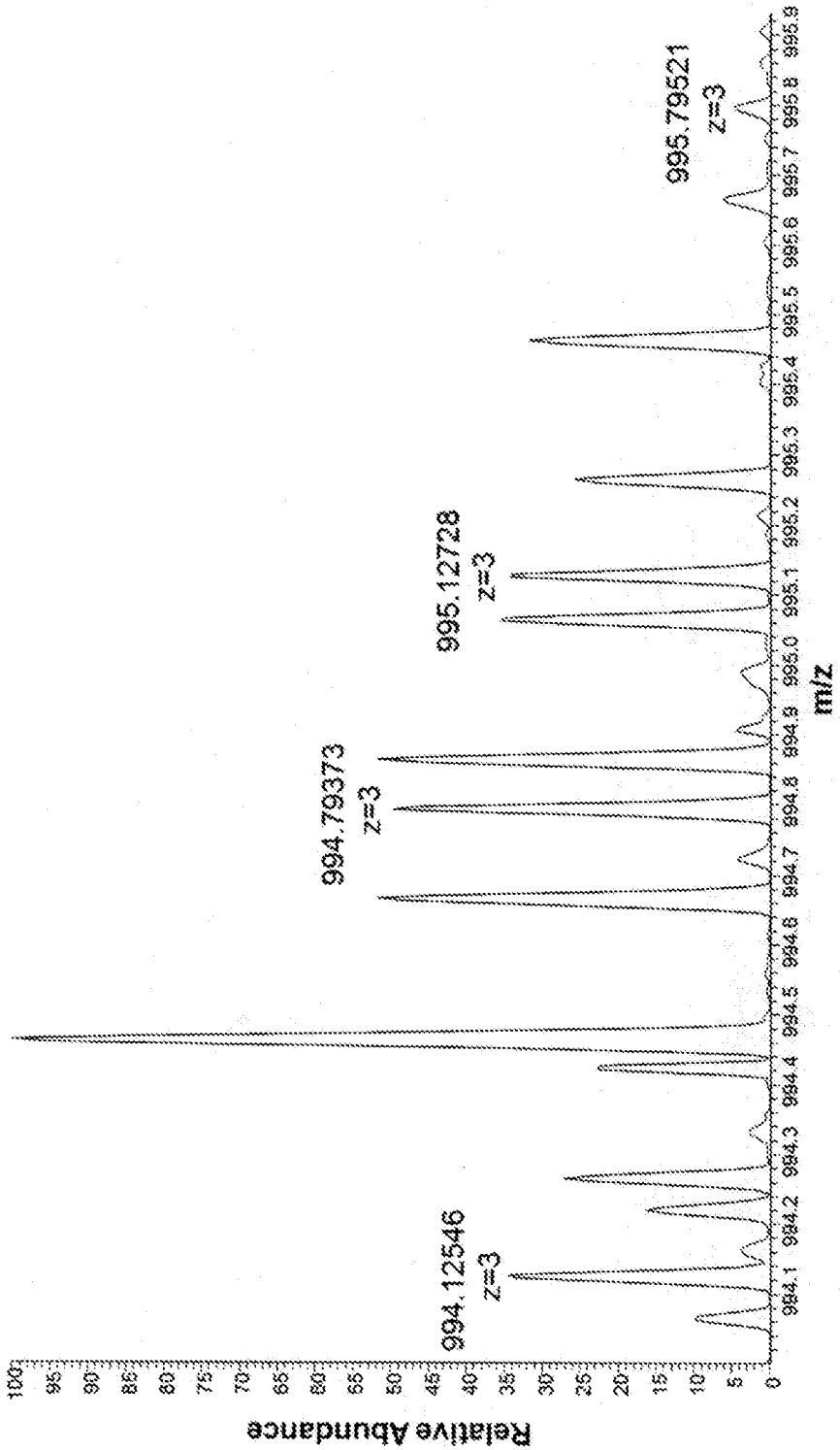
[図11]


929.49651
z=2
929.99814
z=2
930.49938
z=2
931.00031
z=2
931.50118
z=2
Relative Abundance
m/z

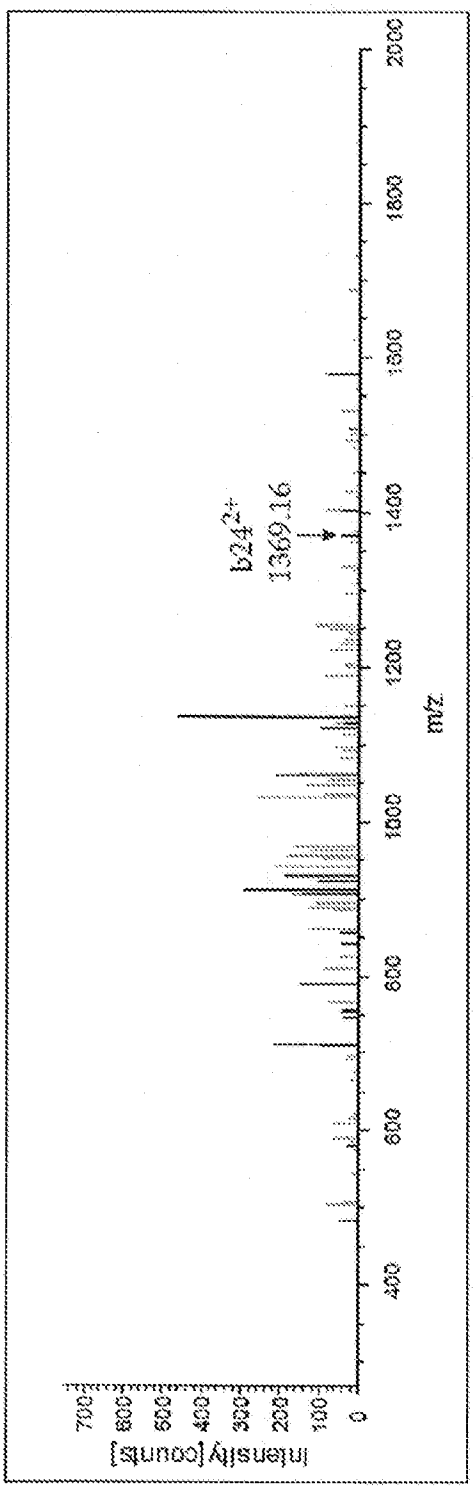
[図12]


Intensity [counts]
0
100
200
300
400
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z
y3+
305.22

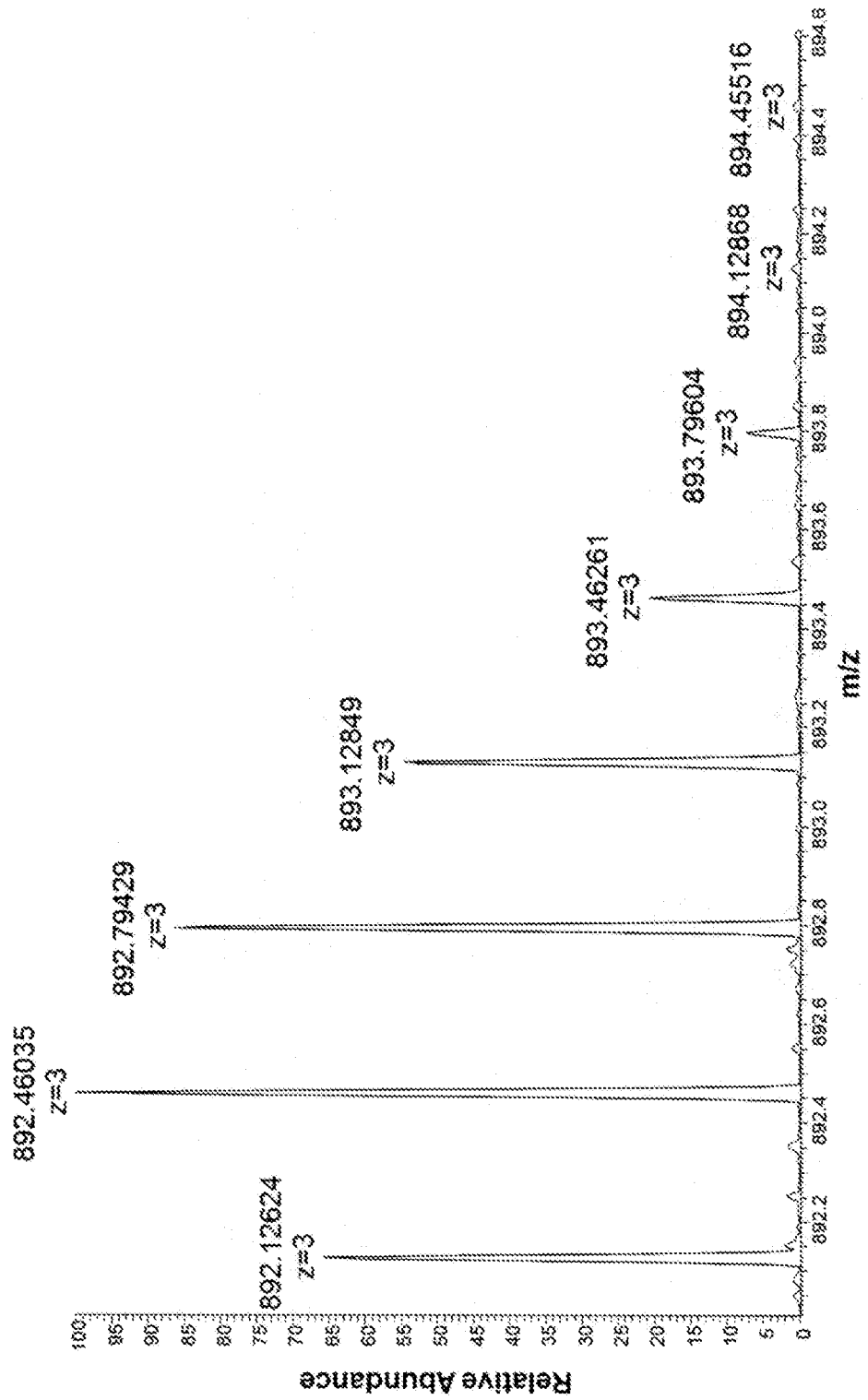
[図13]


994.12546
z=3
994.79373
z=3
995.12728
z=3
995.79521
z=3
m/z
Relative Abundance

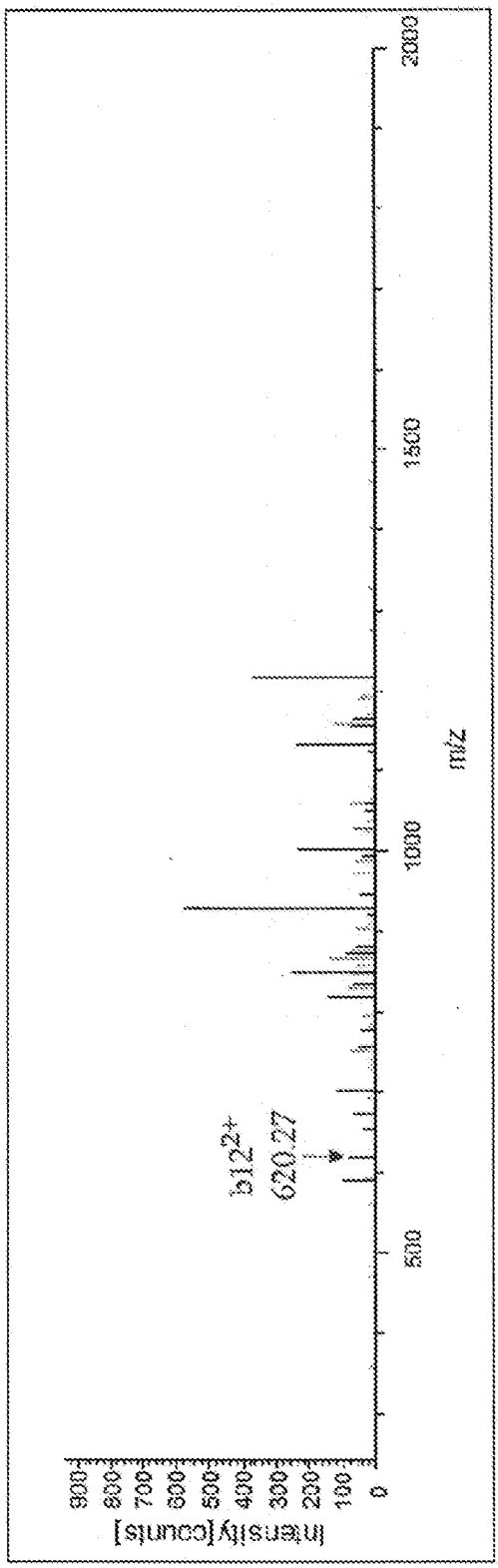
[図14]


b24 2+
1369.16
m/z
Intensity [counts]
0
100
200
300
400
500
600
700
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

[図15]


892.46035
z=3
892.79429
z=3
893.12849
z=3
893.46261
z=3
893.79604
z=3
894.12868
z=3
894.45516
z=3
892.12624
z=3
Relative Abundance
m/z

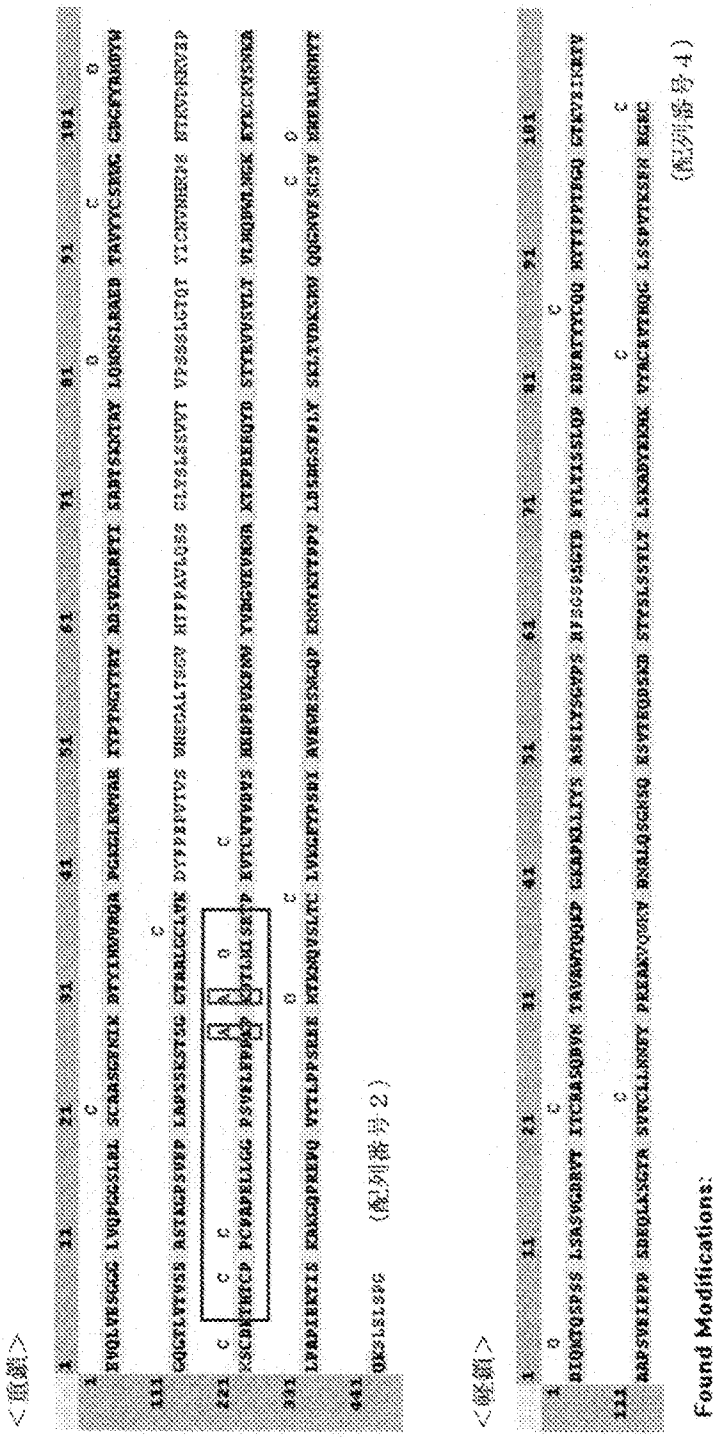
[図16]


Intensity[counts]
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
500
1000
1500
2000
m/z
b12 2+
620.27

[図17]

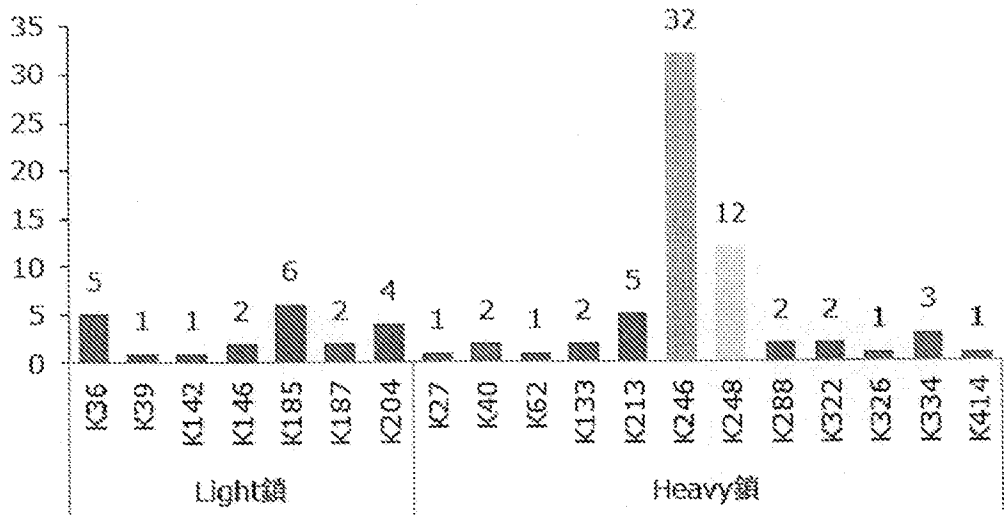
PKSCDKTHTCPPCPAPEXXGXPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
DSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRXEXTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKXTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号1)

[図18]

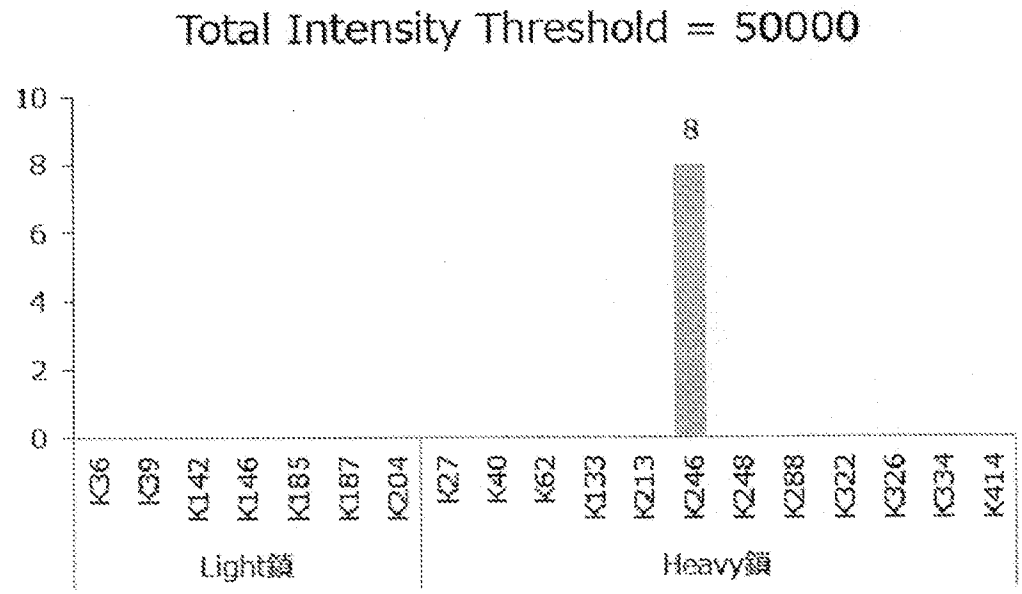

<重鎖>
(配列番号2)
<軽鎖>
(配列番号4)
Found Modifications:
A Azide_linker (K)
C Carbamidomethyl (C)
O Oxidation (M)

[図19]

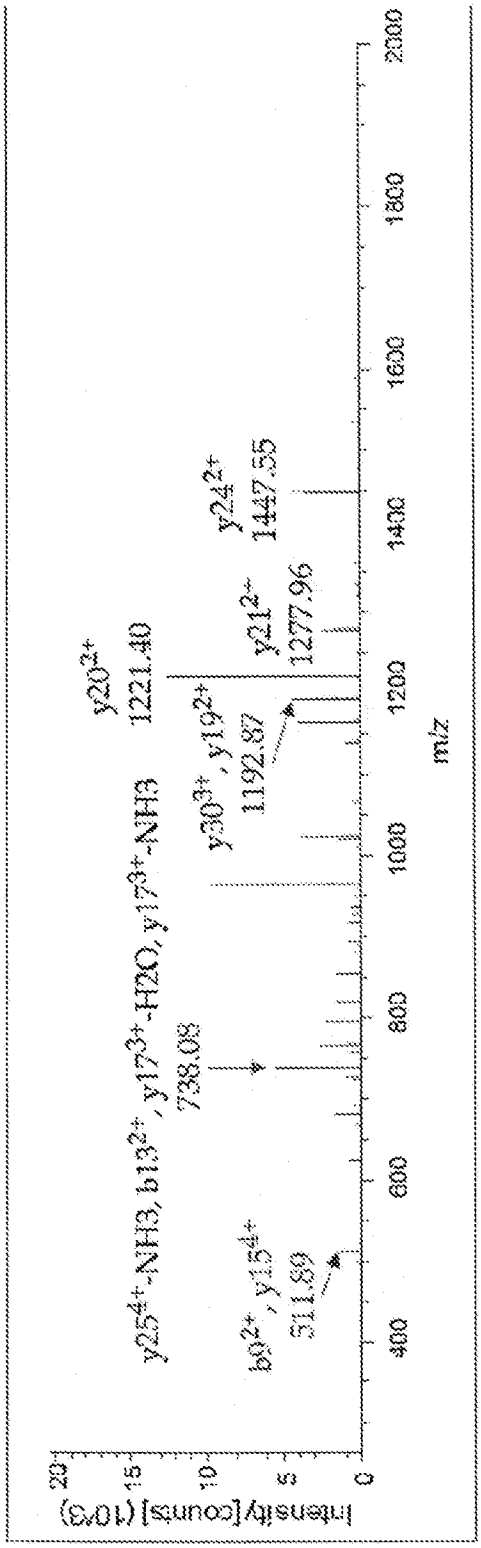
(1)


Total Intensity Threshold = 0
35
30
25
20
15
10
5
0
5
1
1
2
6
2
4
1
2
1
2
5
32
12
2
2
1
3
1
K36
K39
K142
K146
K185
K187
K204
K27
K40
K62
K133
K213
K246
K248
K288
K322
K326
K334
K414
Light鎖
Heavy鎖

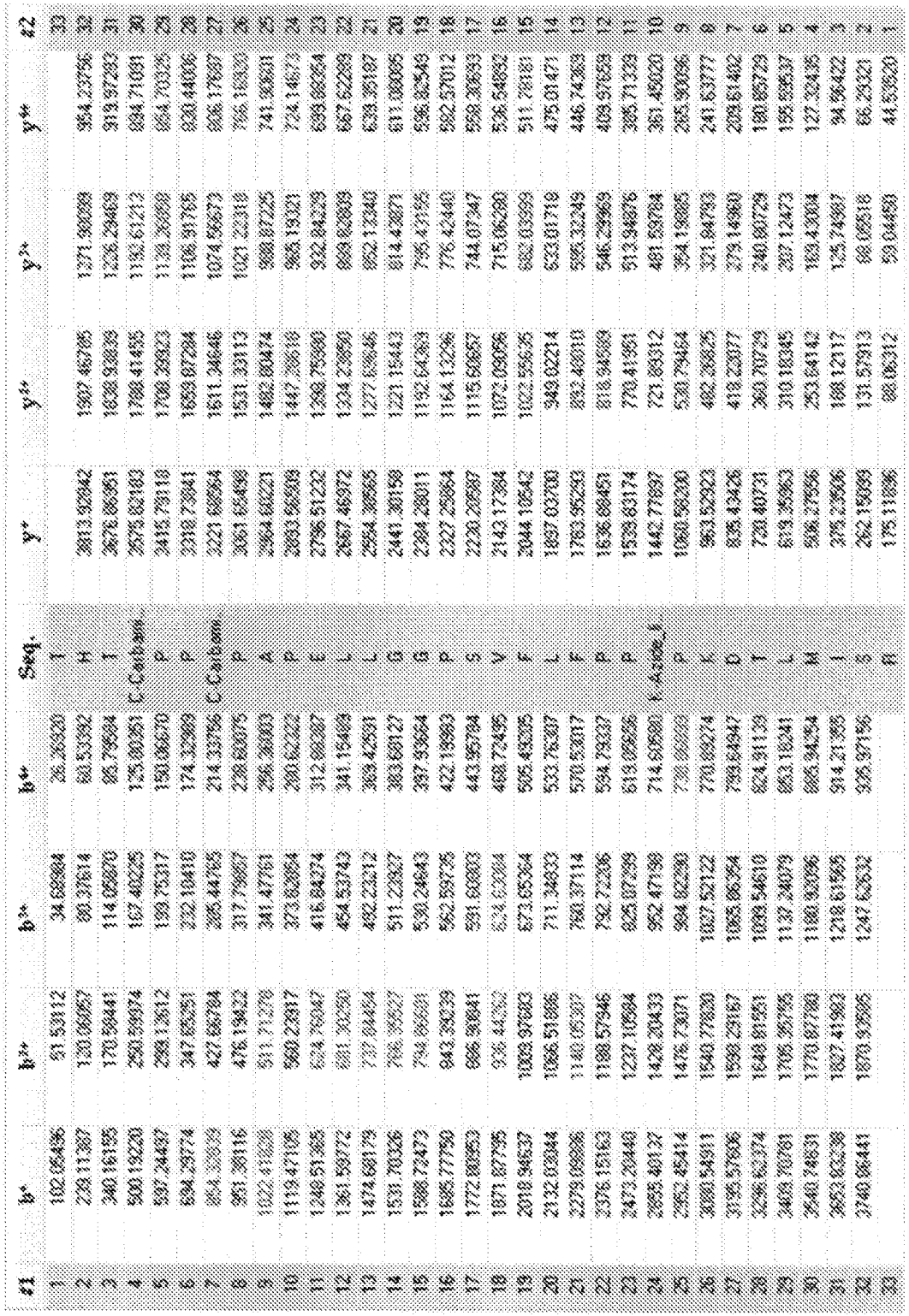
(2)


Total Intensity Threshold = 50000
10
8
6
4
2
0
8
K36
K39
K142
K146
K185
K187
K204
K27
K40
K62
K133
K213
K246
K248
K288
K322
K326
K334
K414
Light鎖
Heavy鎖

[図20]

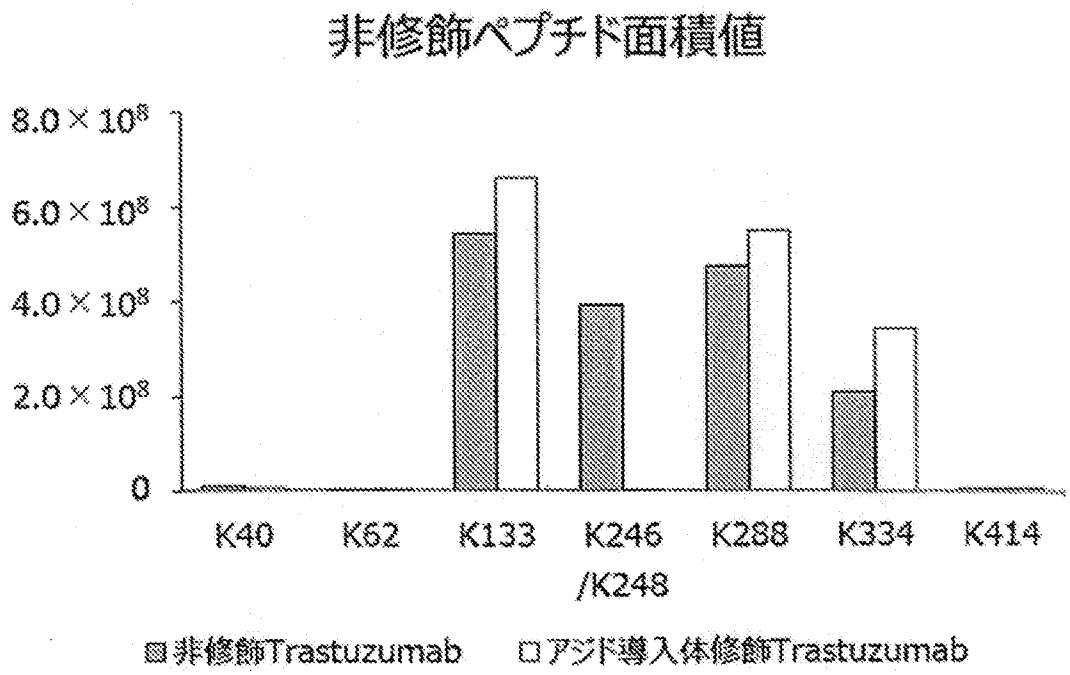

Intensity [counts] (10^3)
m/z
y25^4+-NH3, b13^2+, y17^3+-H2O, y17^3+-NH3
738.08
b9^2+, y15^4+
511.89
y30^3+, y19^2+
1192.87
y20^2+
1221.40
y21^2+
1277.96
y24^2+
1447.55

[図21]

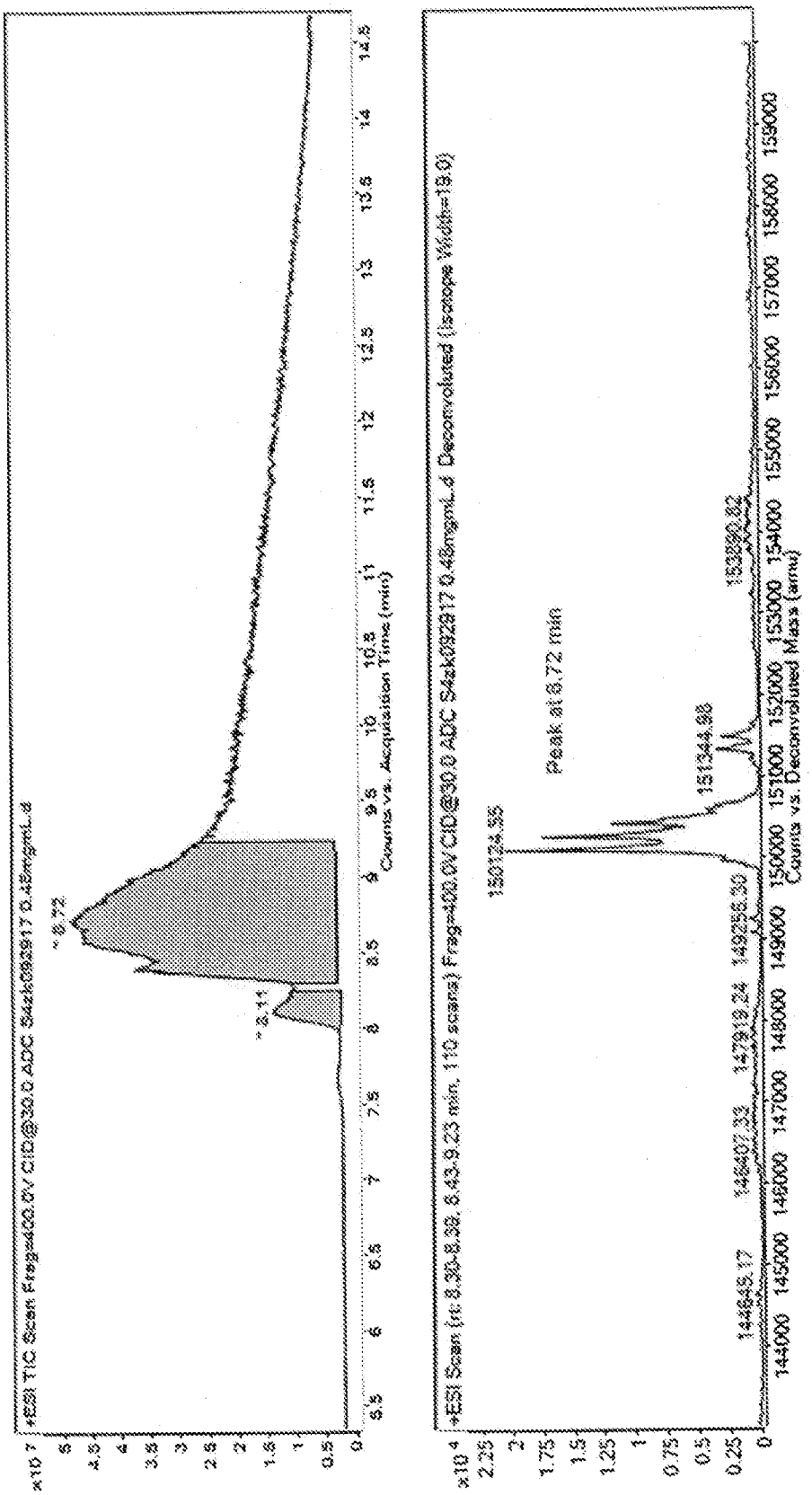


#1	b*	b²⁺	b³⁺	b⁴⁺	Seq.	y*	y²⁺	y³⁺	y⁴⁺	#2
1	102.054436	51.53112	34.689884	26.26530	T					33
2	239.11387	120.06622	80.378614	60.53332	H	3813.92942	1907.46785	1271.98389	954.23756	32
3	340.16155	170.59441	114.066870	85.79684	I	3676.86851	1838.93839	1226.29469	919.97282	31
4	500.19220	250.59974	167.40235	125.80261	C-Carbam.	3575.82183	1788.41455	1193.61212	894.71081	30
5	597.24497	299.13612	199.75317	150.06670	P	3415.79118	1708.39923	1139.26502	854.70325	29
6	694.29774	347.65251	232.10418	174.32869	P	3318.73841	1659.87284	1106.91765	830.44006	28
7	854.35033	427.68784	285.44705	214.33756	C-Carbam.	3221.68564	1611.34646	1074.56572	806.17697	27
8	951.39110	476.19422	317.79807	238.60075	P	3061.63456	1531.32113	1021.22318	766.18330	26
9	1022.41828	511.71278	341.47761	256.36003	A	2964.60221	1482.80474	988.87225	741.90631	25
10	1119.47105	560.22917	373.82064	280.62232	P	2893.58008	1447.28618	965.19321	724.14672	24
11	1246.51365	624.76047	416.84274	312.88287	E	2796.51232	1398.75980	932.84239	699.88264	23
12	1361.59972	681.80350	454.53743	341.15469	L	2667.46972	1334.23850	889.82089	667.62289	22
13	1474.68179	737.84454	492.23312	369.42591	L	2554.38565	1277.69646	852.13340	639.35187	21
14	1531.70326	766.35527	511.23937	383.66127	G	2441.30159	1221.15443	814.43871	611.08985	20
15	1588.72473	794.86681	530.24443	397.93664	G	2384.28011	1192.64369	795.43125	596.86345	19
16	1685.77750	843.39039	562.59735	422.19963	P	2227.25864	1164.13296	776.42440	582.57012	18
17	1772.80953	886.90841	591.60803	443.95794	S	2220.20597	1115.59857	744.07347	558.30653	17
18	1871.87795	936.44352	624.63004	468.72495	V	2143.17384	1072.09056	715.06260	536.54852	16
19	2018.94537	1009.97803	673.65304	505.49335	F	2044.10542	1022.55635	682.03599	511.78181	15
20	2132.03344	1066.51886	711.34633	533.76307	L	1897.03700	949.02214	633.01710	475.01471	14
21	2279.09808	1140.05307	760.37114	570.53017	F	1783.95233	892.48010	595.32349	446.74383	13
22	2376.15163	1188.57946	792.72206	594.79327	P	1636.89453	818.94589	546.29969	409.97639	12
23	2473.20448	1237.10584	825.07299	619.05635	P	1539.83174	770.41951	513.94676	385.71339	11
24	2655.40127	1428.20433	952.47139	714.60681	4-Azide_K	1442.77897	721.89312	481.59784	361.45020	10
25	2952.45414	1476.73071	984.82230	738.86778	P	1260.58230	630.79484	394.19885	295.90056	9
26	3089.54911	1545.27820	1027.52122	770.88274	K	963.52923	482.26825	321.84703	241.63777	8
27	3196.57606	1598.29167	1065.86354	799.64947	D	835.48426	418.23077	279.14980	209.61492	7
28	3296.62374	1648.81551	1099.54618	824.91139	T	728.40723	364.70725	243.80729	180.85729	6
29	3469.70761	1735.35745	1157.24079	868.11841	L	629.35963	315.18345	210.46134	157.84337	5
30	3540.74531	1770.87703	1180.92036	885.94754	M	506.27556	253.64142	169.43004	127.22435	4
31	3653.03238	1827.41983	1218.61565	914.21385	I	375.23505	188.12117	125.74997	94.56422	3
32	3740.08441	1870.93585	1247.62532	935.97156	S	262.15059	131.57913	88.05818	66.29321	2
33					R	175.11896	88.06312	59.04459	44.53529	1

[図22]


非修飾ペプチド面積値
8.0×10^8
6.0×10^8
4.0×10^8
2.0×10^8
0
K40
K62
K133
K246 /K248
K288
K334
K414
非修飾Trastuzumab
アジド導入体修飾Trastuzumab

[図23]


+ESI TIC Scan Frag=400.0V CID@30.0 ADC S4zk092917 0.48mgmL.d
8.72
8.11
Counts vs. Acquisition Time (min)
+ESI Scan (rt: 8.30-8.38, 8.43-9.23 min, 110 scans) Frag=400.0V CID@30.0 ADC S4zk092917 0.48mgmL.d Deconvoluted (Isotope Width=19.0)
Peak at 8.72 min
150124.55
151344.98
153390.82
146407.33
147819.24
149255.30
144649.17
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

[図24]

(1) >Trastuzumab Light chain

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (配列番号４)

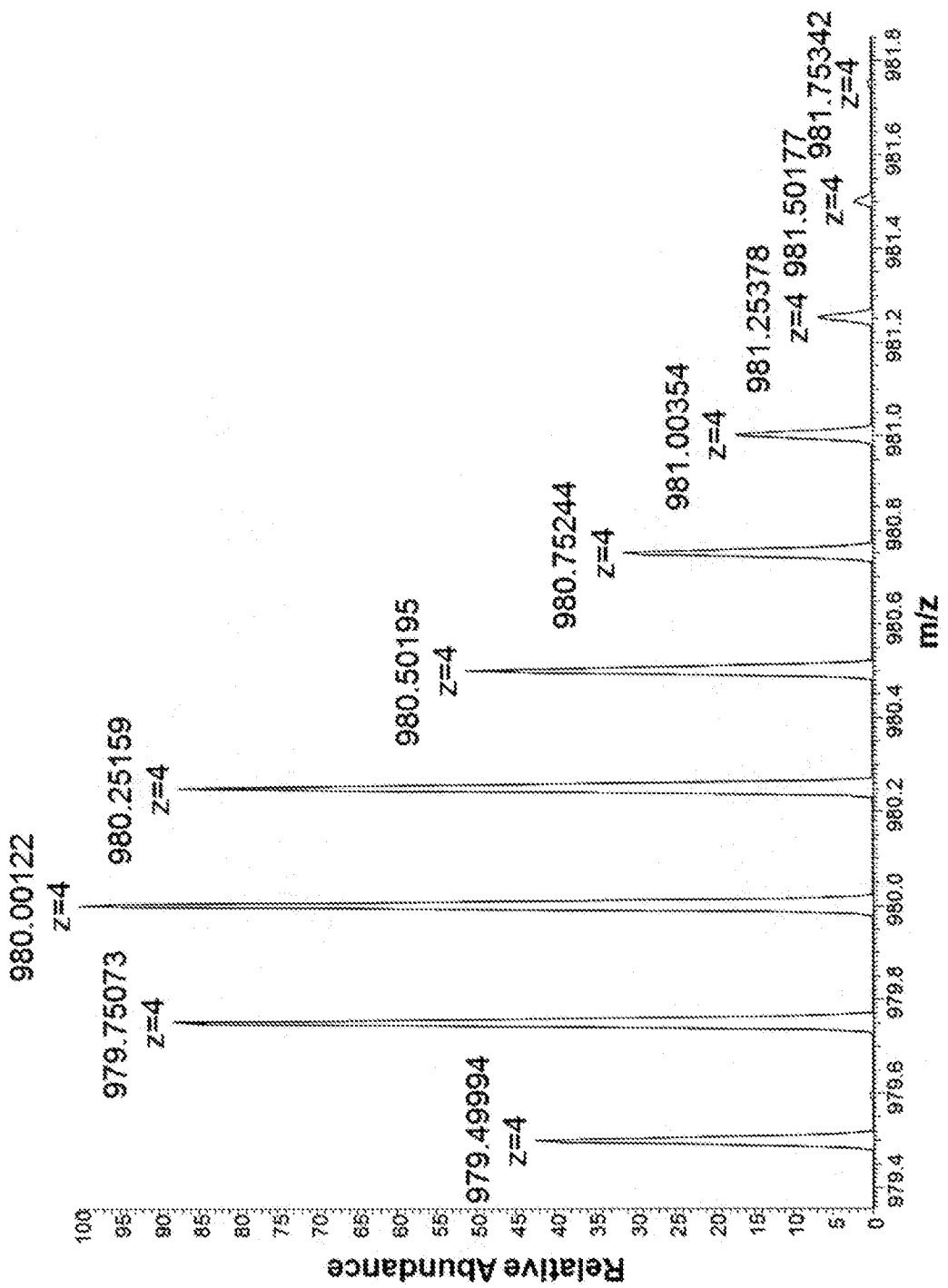
(2) > Trastuzumab Heavy chain

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (配列番号５３)

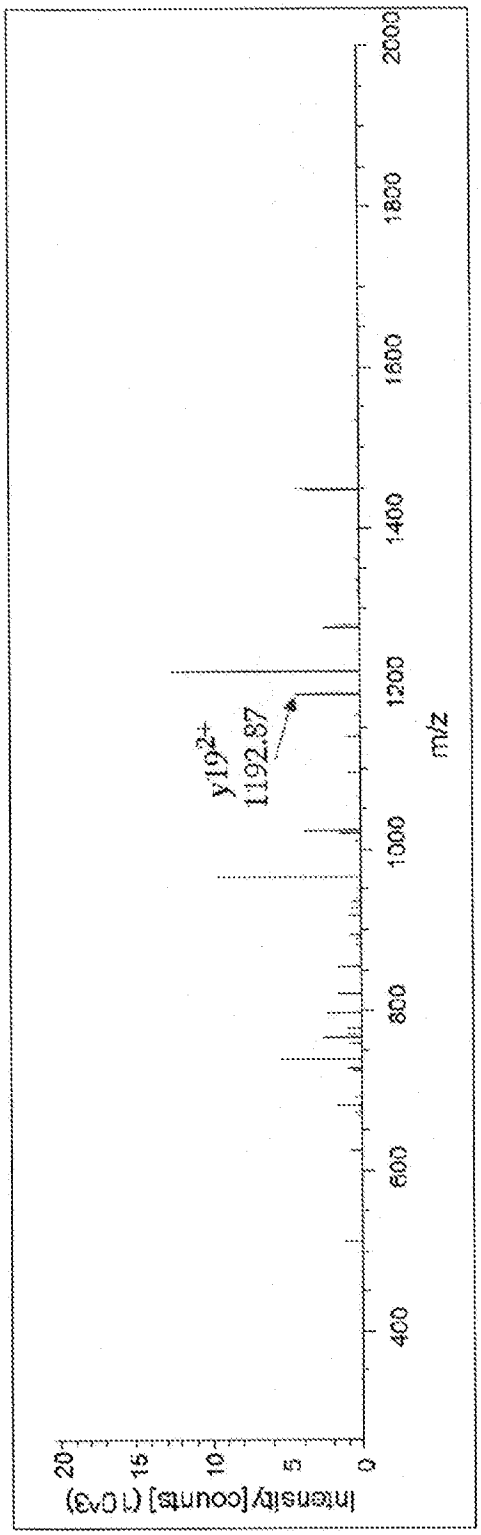
(3) > Trastuzumab Heavy chain (N30Q)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYD
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (配列番号２)

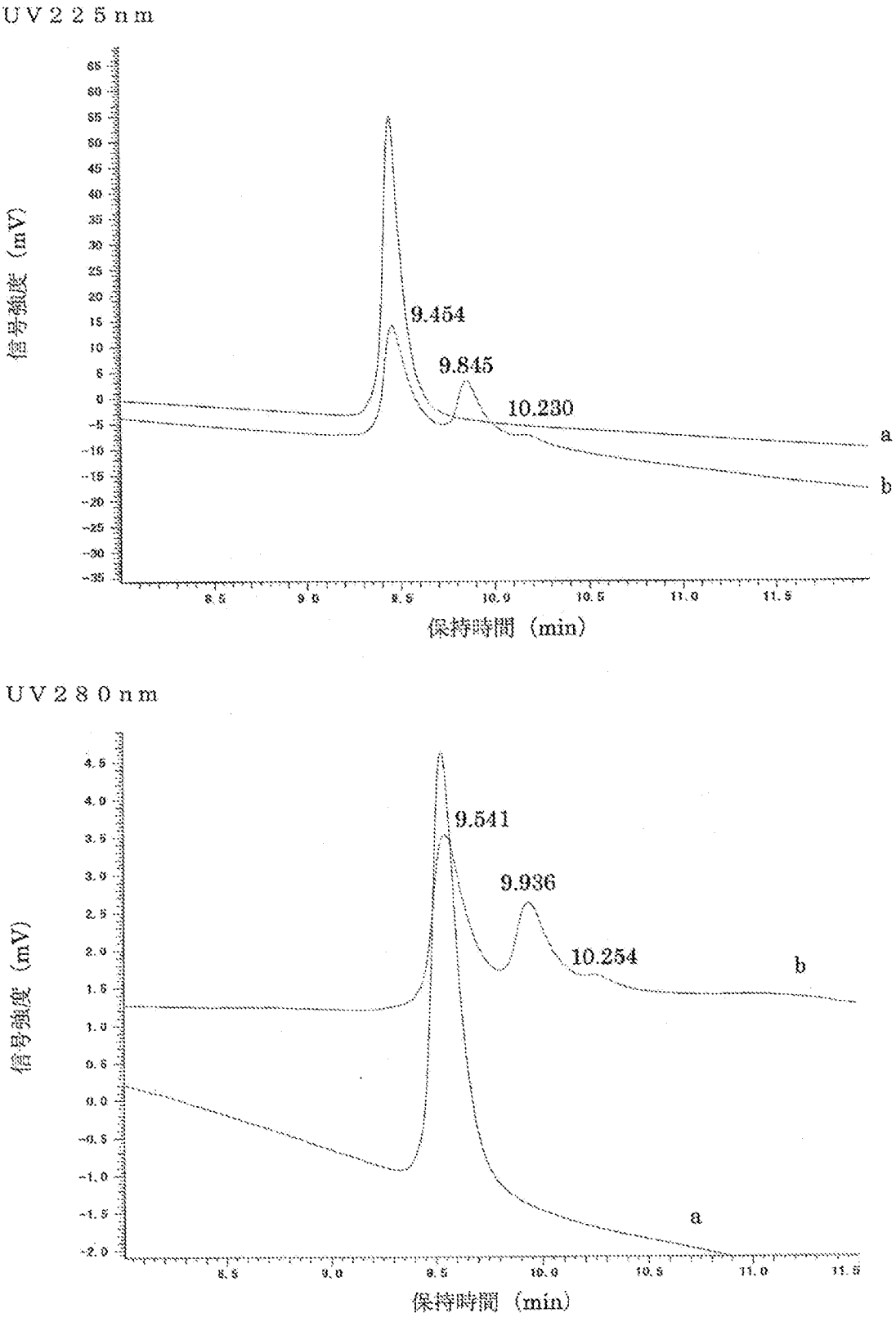
[図25]


980.00122
z=4
980.25159
z=4
980.50195
z=4
980.75244
z=4
981.00354
z=4
981.25378
z=4
981.50177
z=4
981.75342
z=4
979.75073
z=4
979.49994
z=4
Relative Abundance
m/z

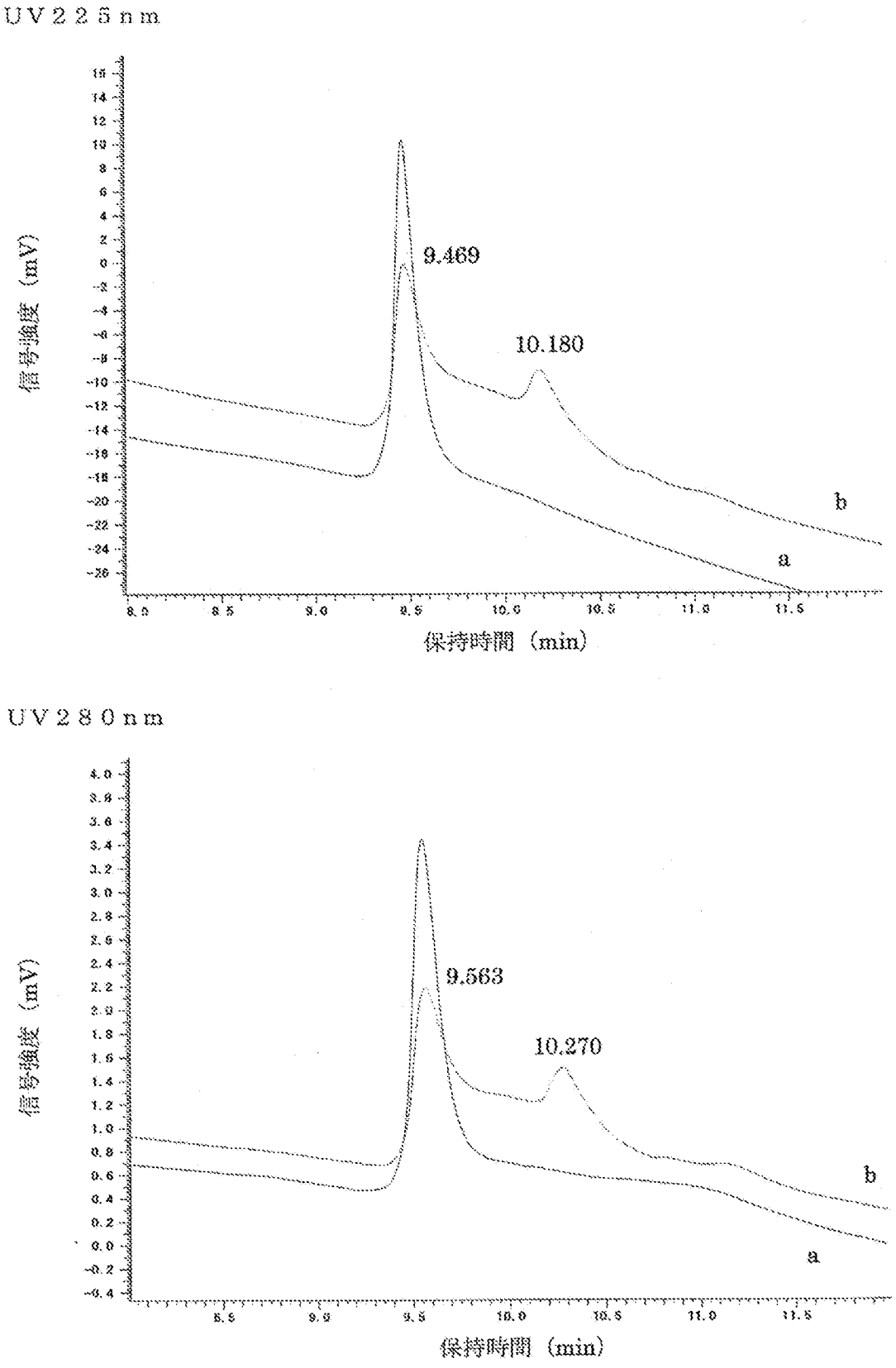
[図26]


y19 2+
1192.87
m/z
Intensity [counts] (x 10^3)
0
5
10
15
20
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

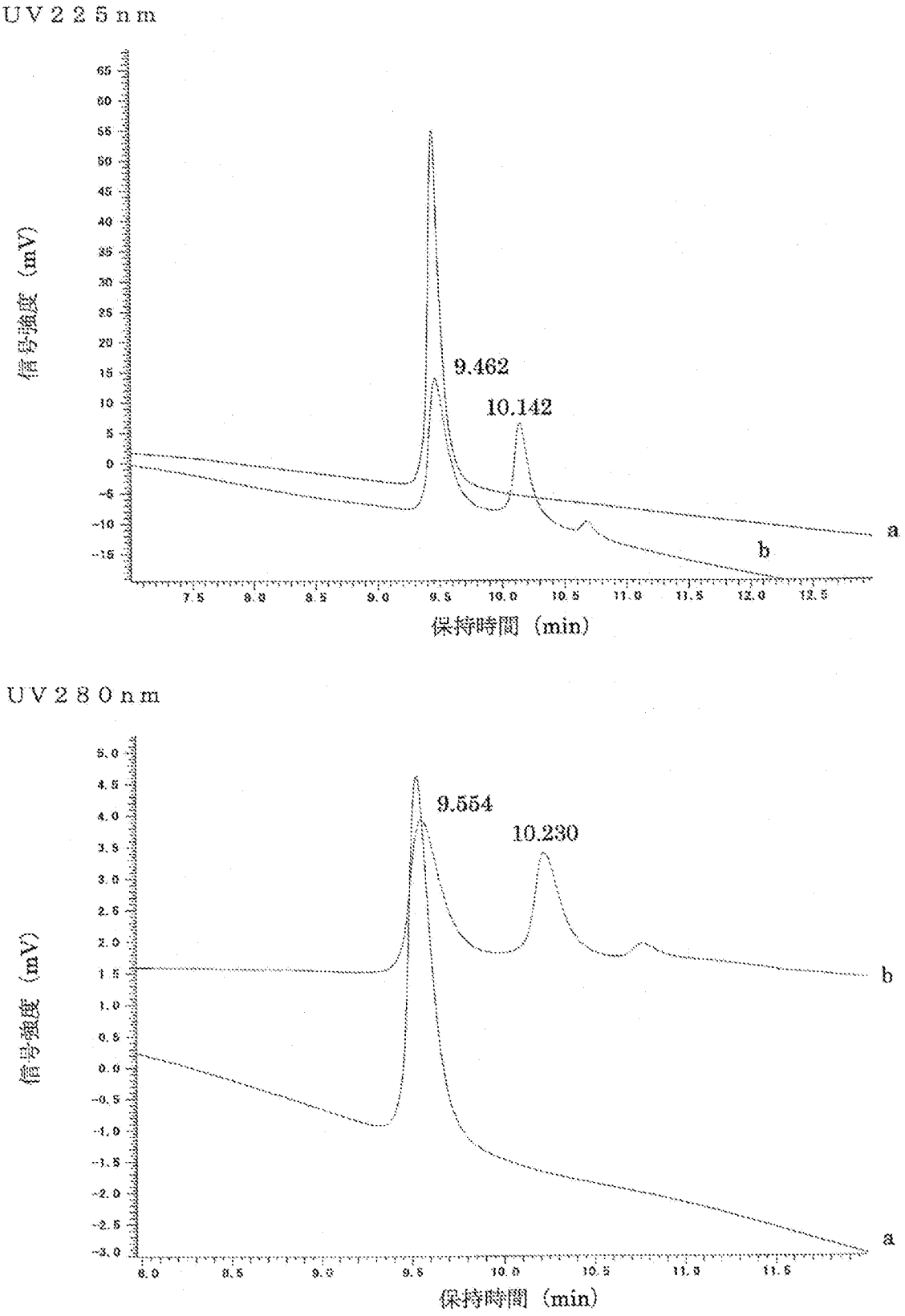
[図27]


UV225nm
信号強度（mV）
9.454
9.845
10.230
a
b
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
9.541
9.936
10.254
b
a
保持時間（min）

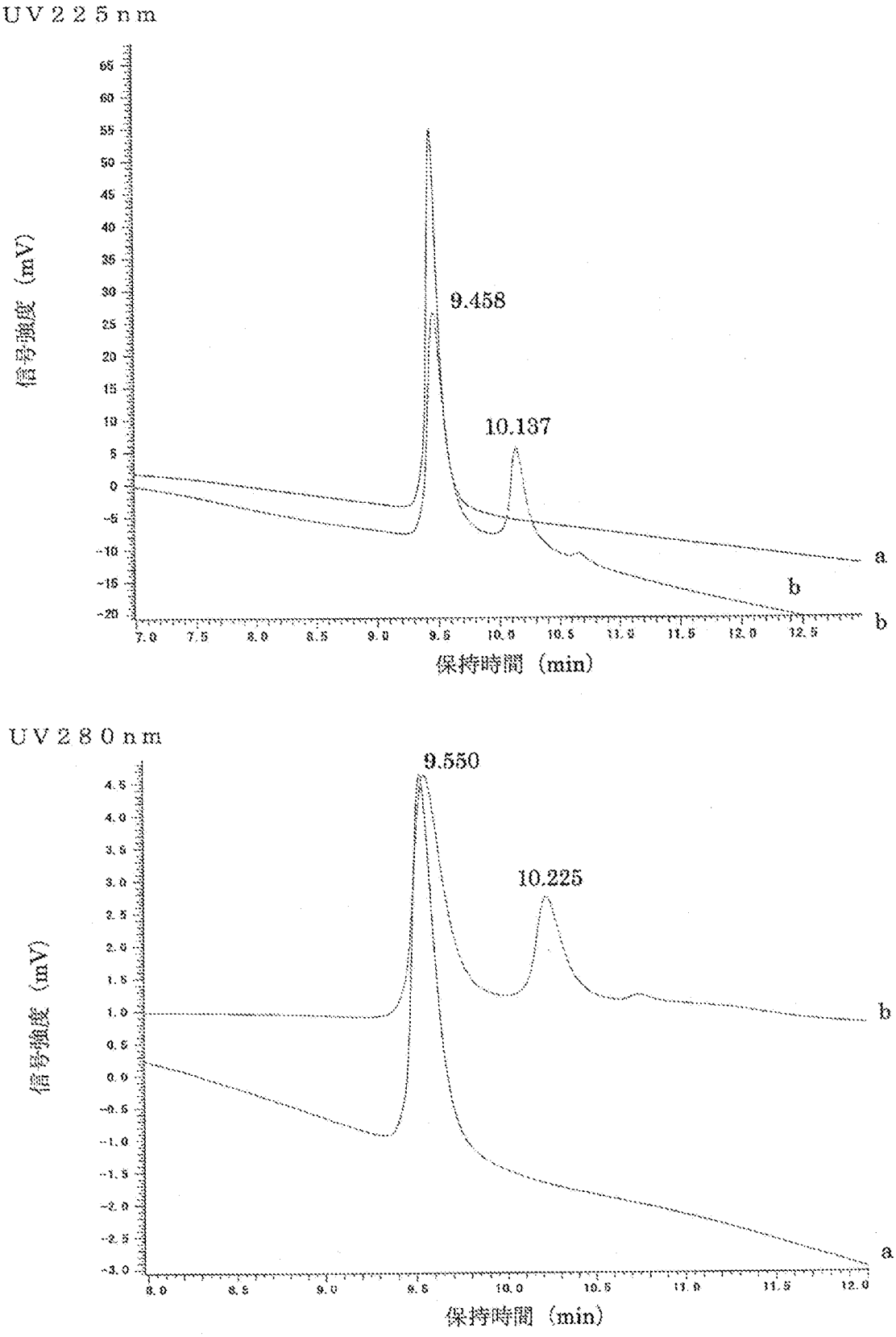
[図28]


UV225nm
信号強度（mV）
9.469
10.180
b
a
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
9.563
10.270
b
a
保持時間（min）

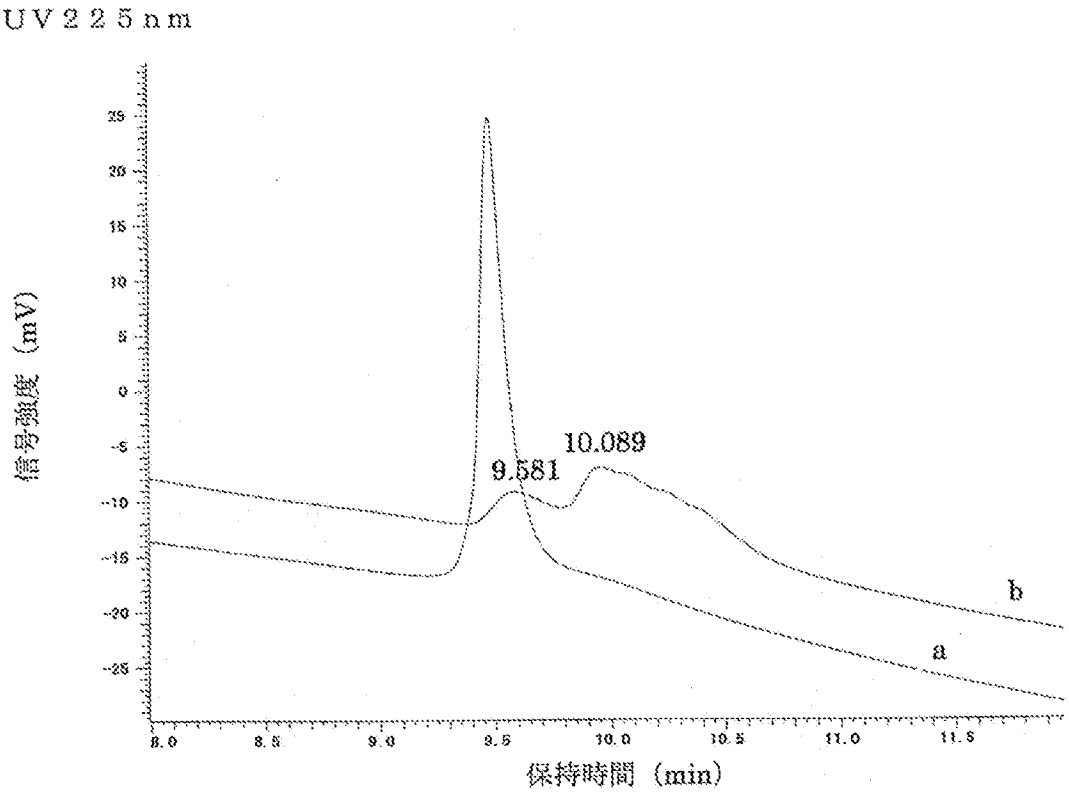
[図29]

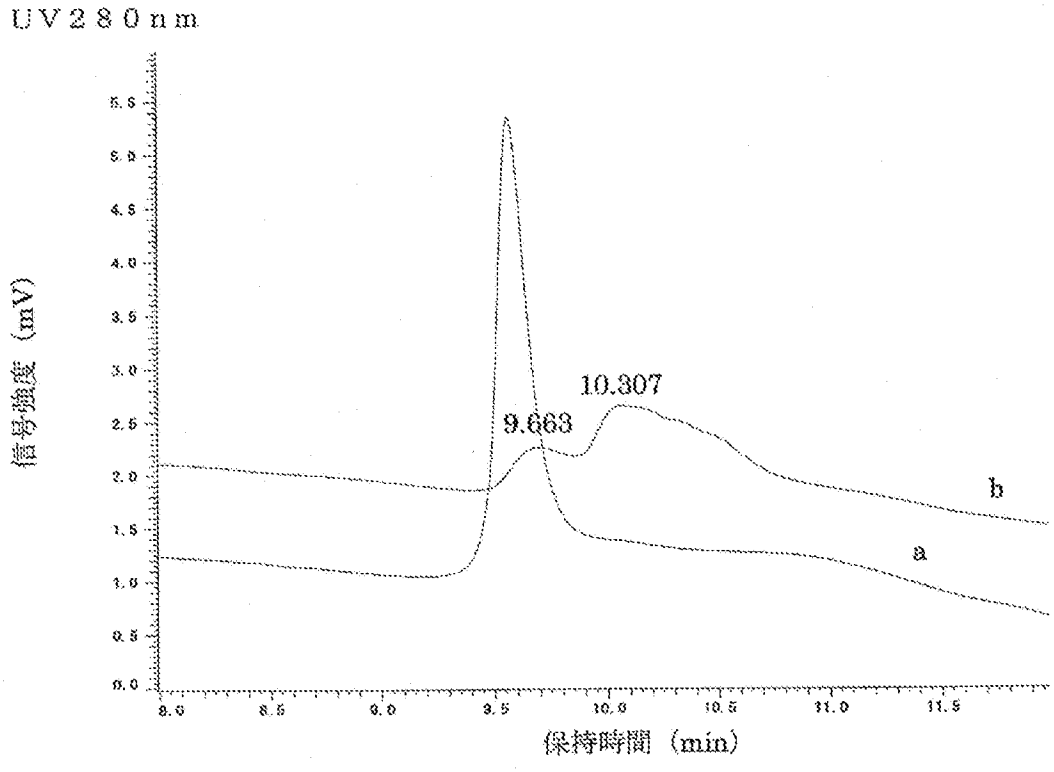

UV225nm
信号強度（mV）
9.462
10.142
a
b
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
9.554
10.230
b
a
保持時間（min）

[図30]

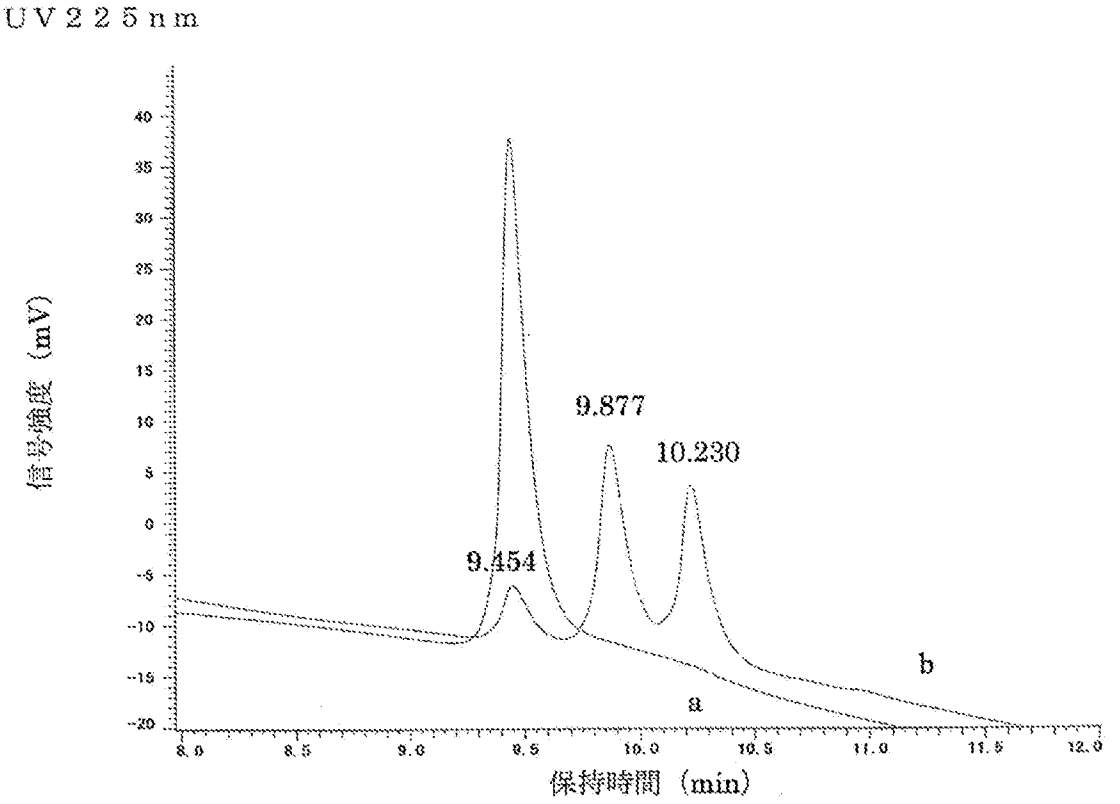

UV225nm
信号強度（mV）
9.458
10.137
a
b
b
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
9.550
10.225
b
a
保持時間（min）

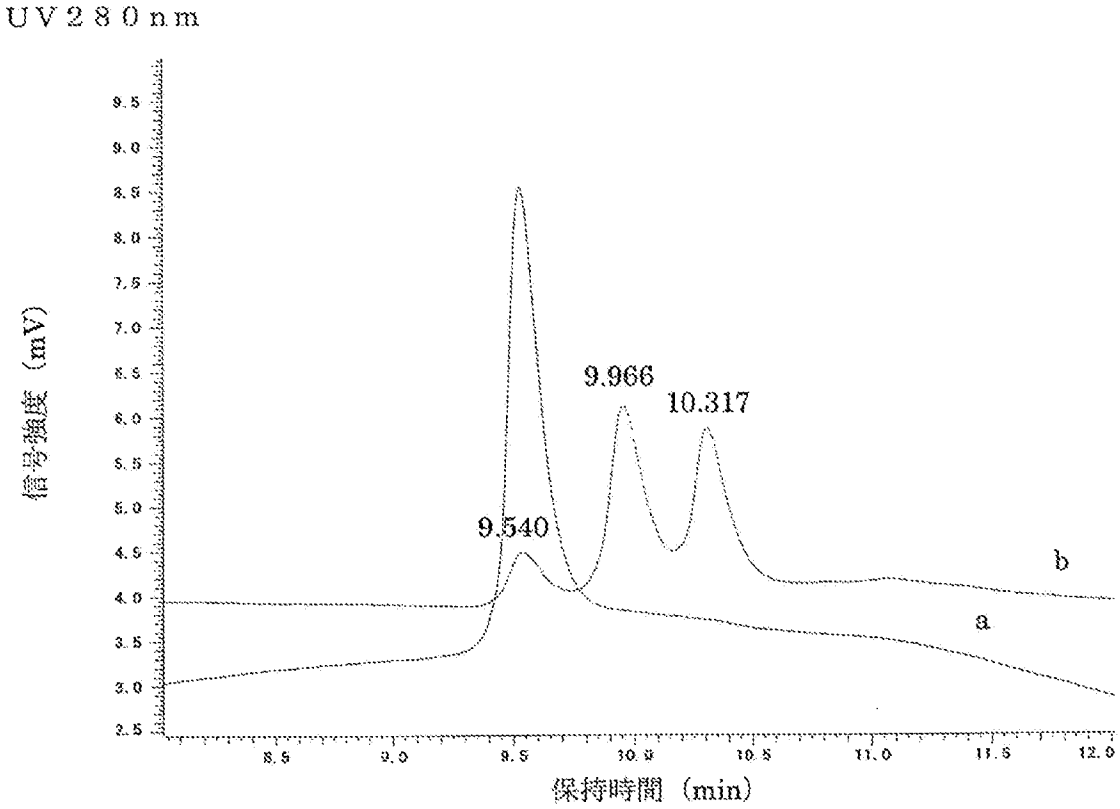
[図31]


UV225nm
信号強度（mV）
10.089
9.581
b
a
保持時間（min）

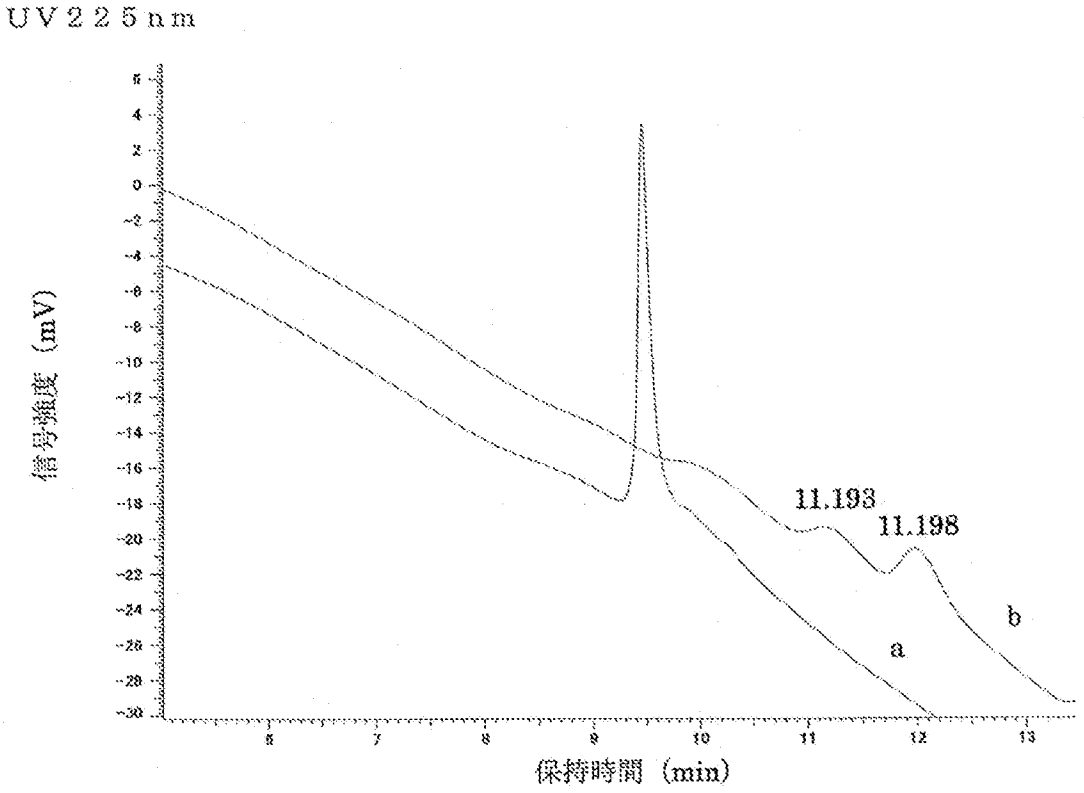

UV280nm
信号強度（mV）
10.307
9.663
b
a
保持時間（min）

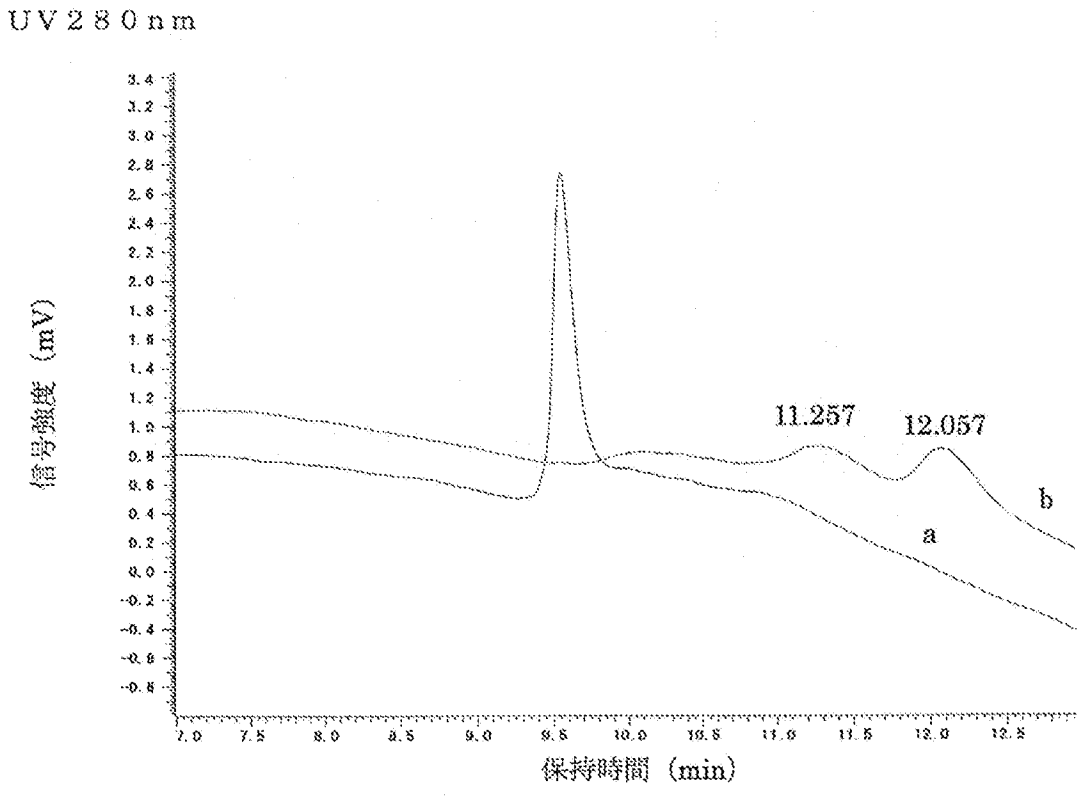
[図32]


UV225nm
信号強度（mV）
9.877
10.230
9.454
b
a
保持時間（min）

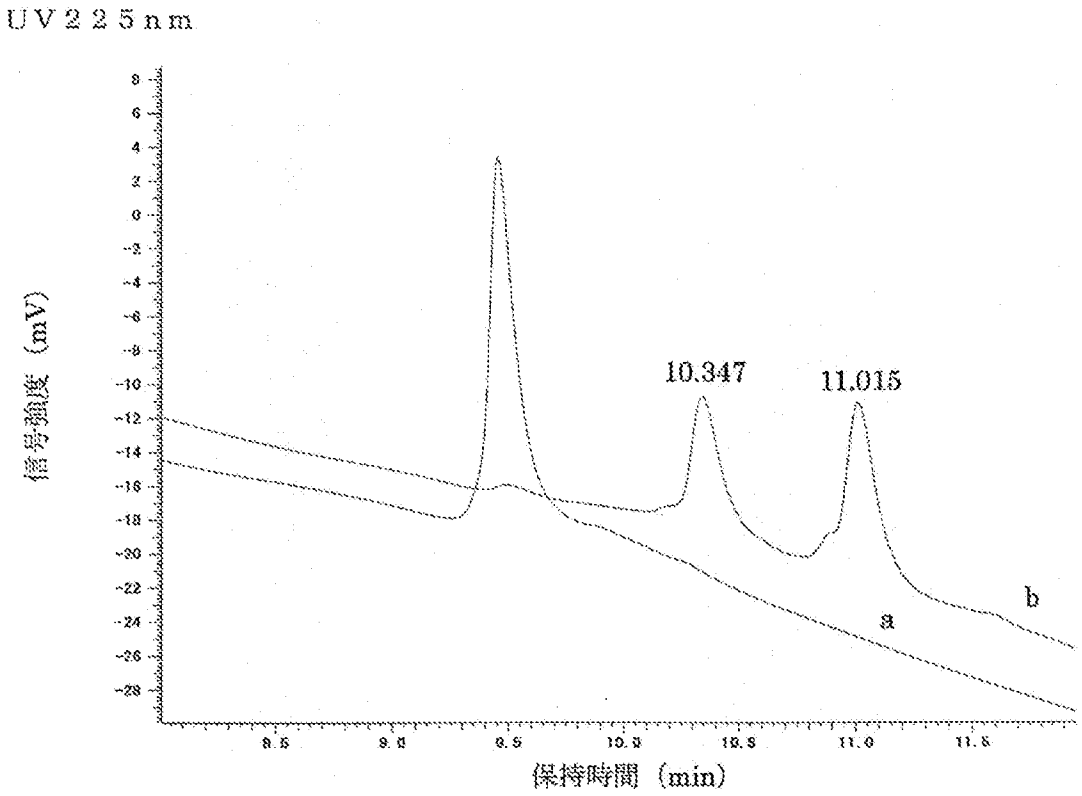

UV280nm
信号強度（mV）
9.966
10.317
9.540
b
a
保持時間（min）

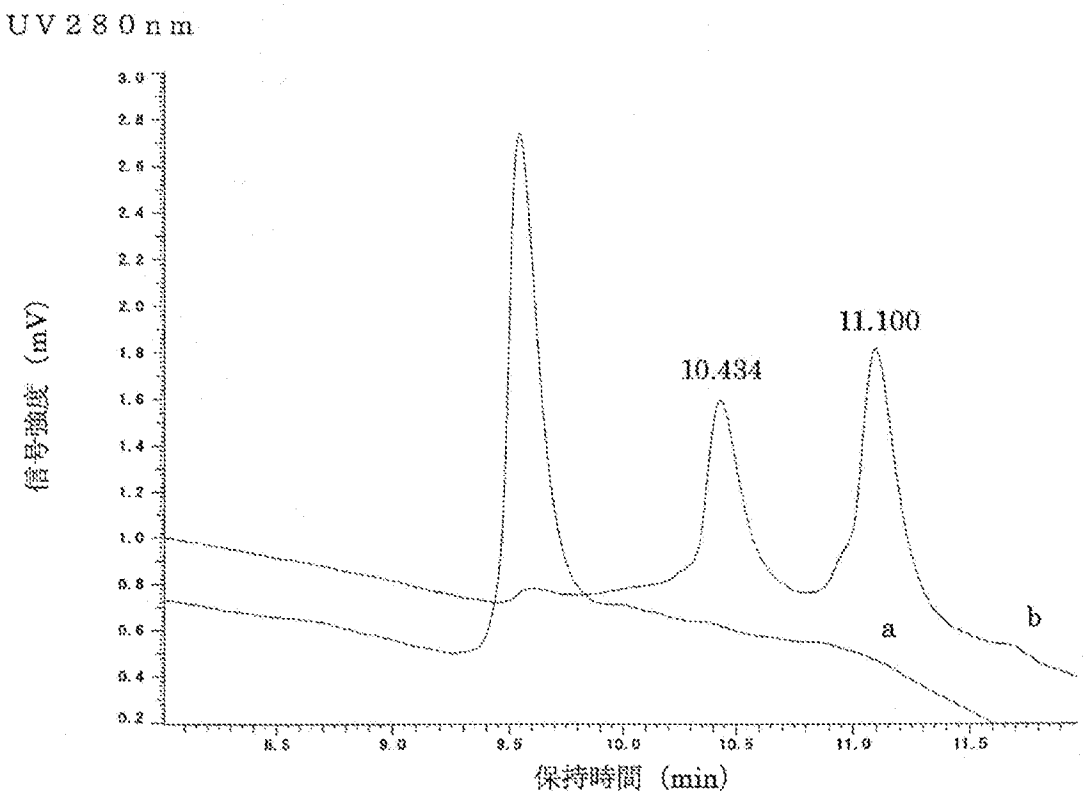
[図33]


UV225nm
信号強度（mV）
保持時間（min）
11.193
11.198
a
b

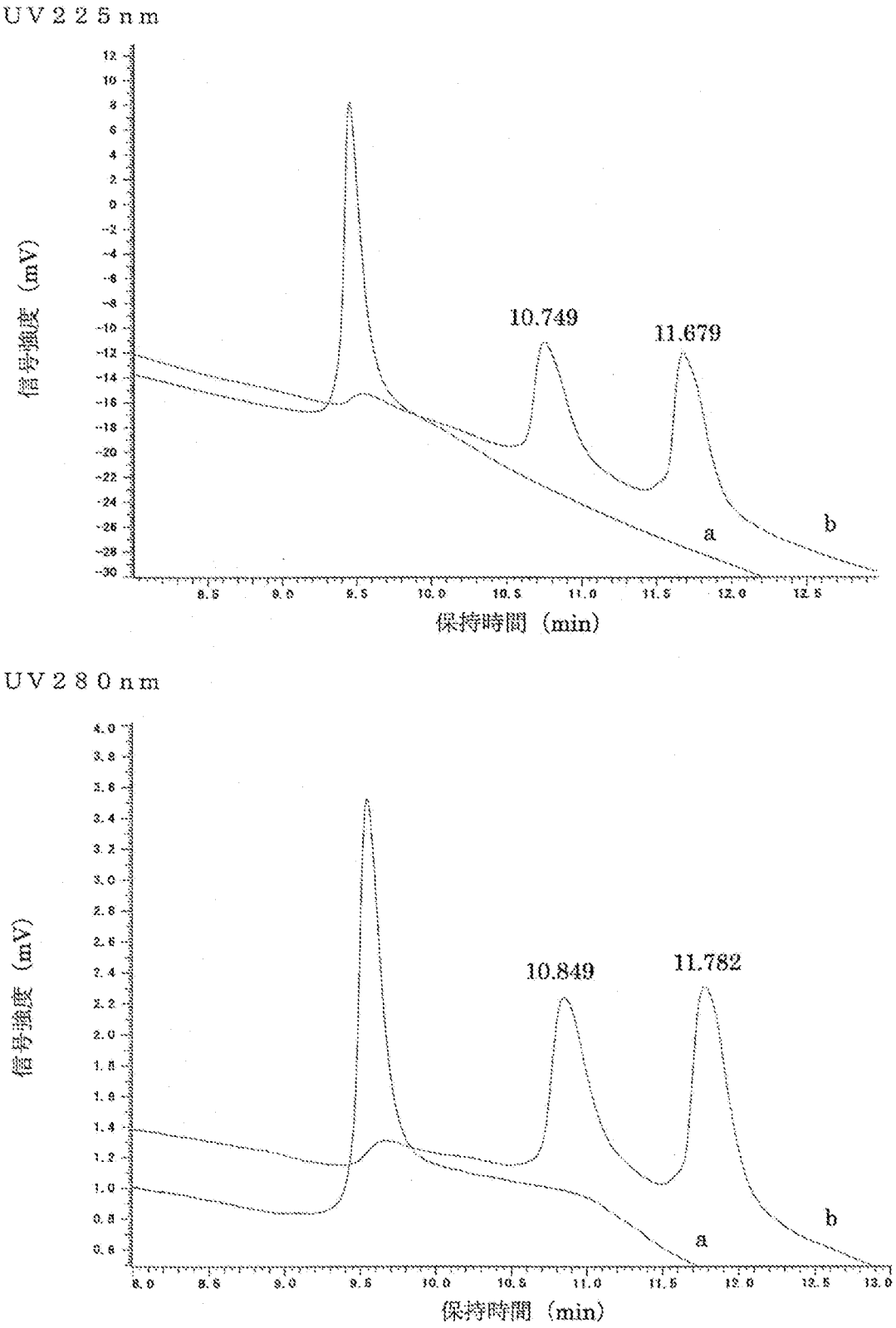

UV280nm
信号強度（mV）
保持時間（min）
11.257
12.057
a
b

[図34]

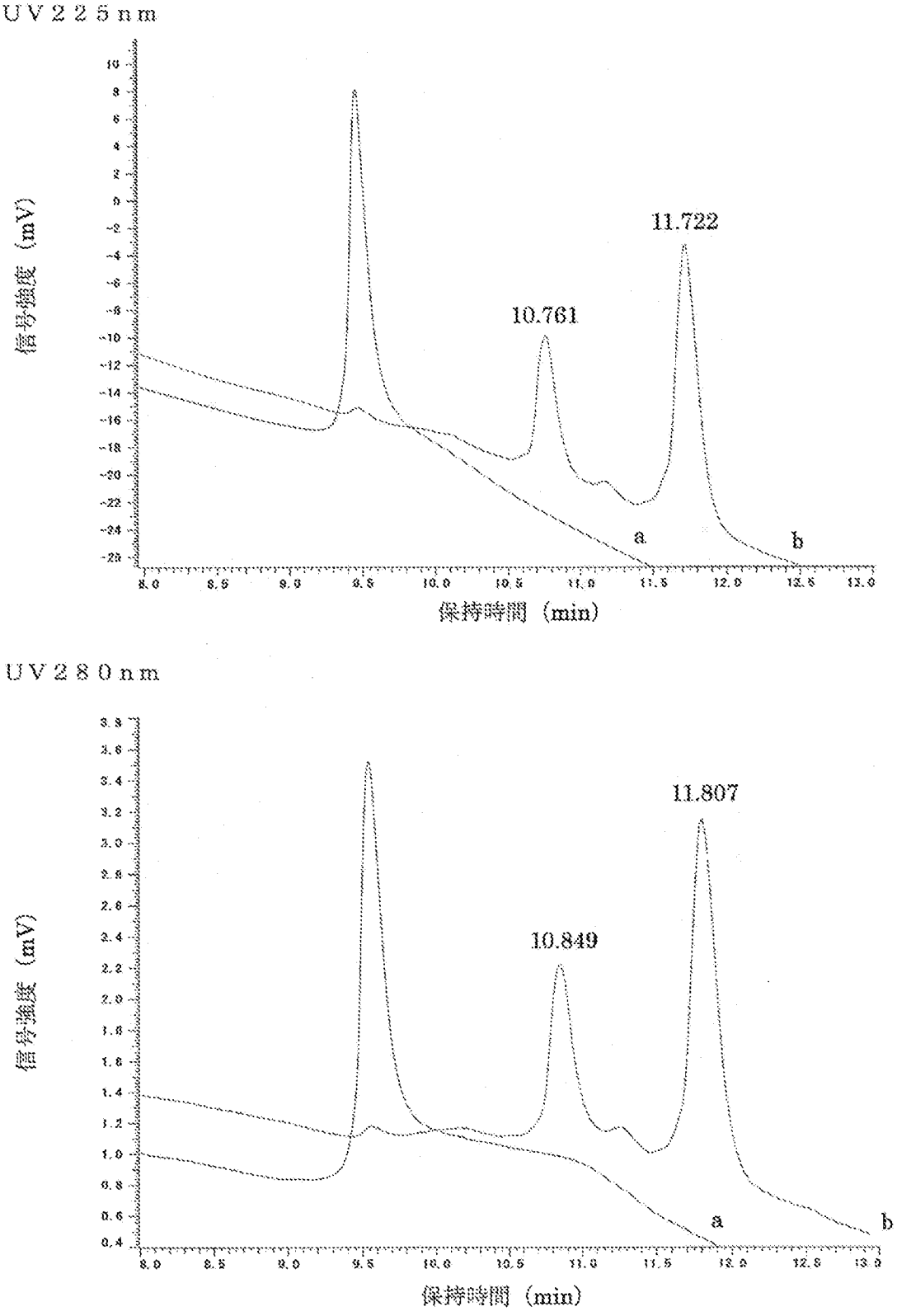

UV225nm
信号強度（mV）
10.347
11.015
a
b
保持時間（min）


UV280nm
信号強度（mV）
11.100
10.434
a
b
保持時間（min）

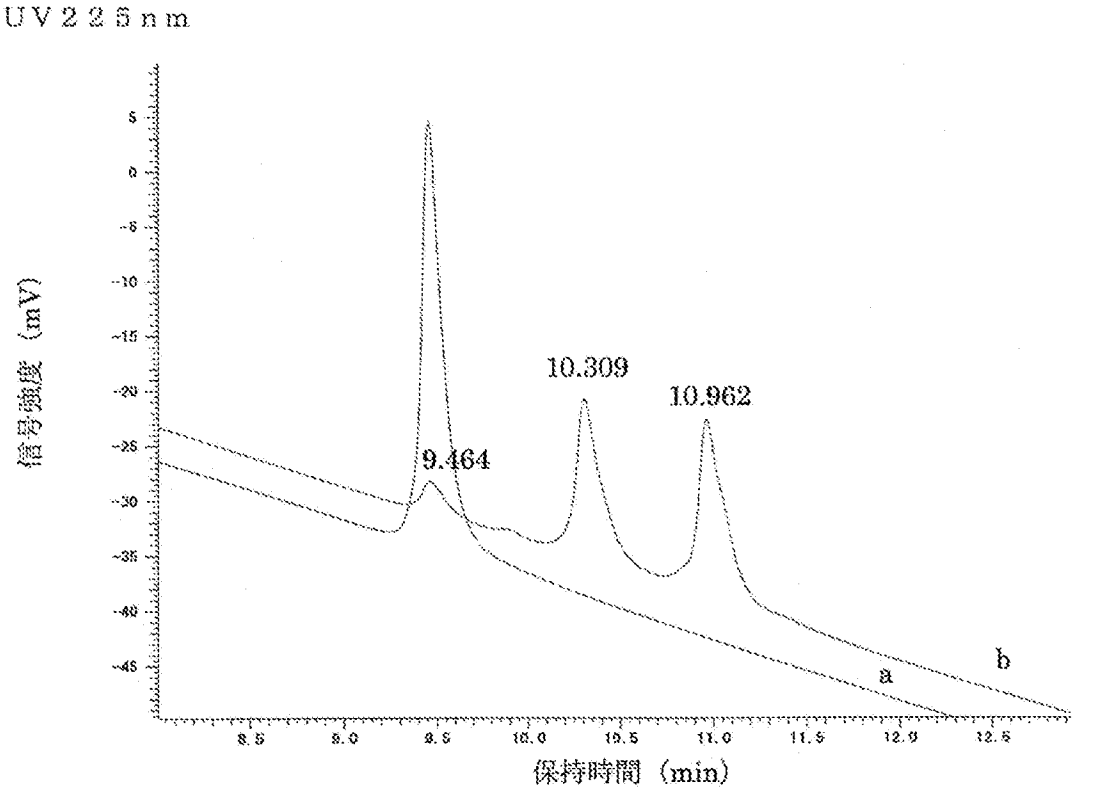
[図35]

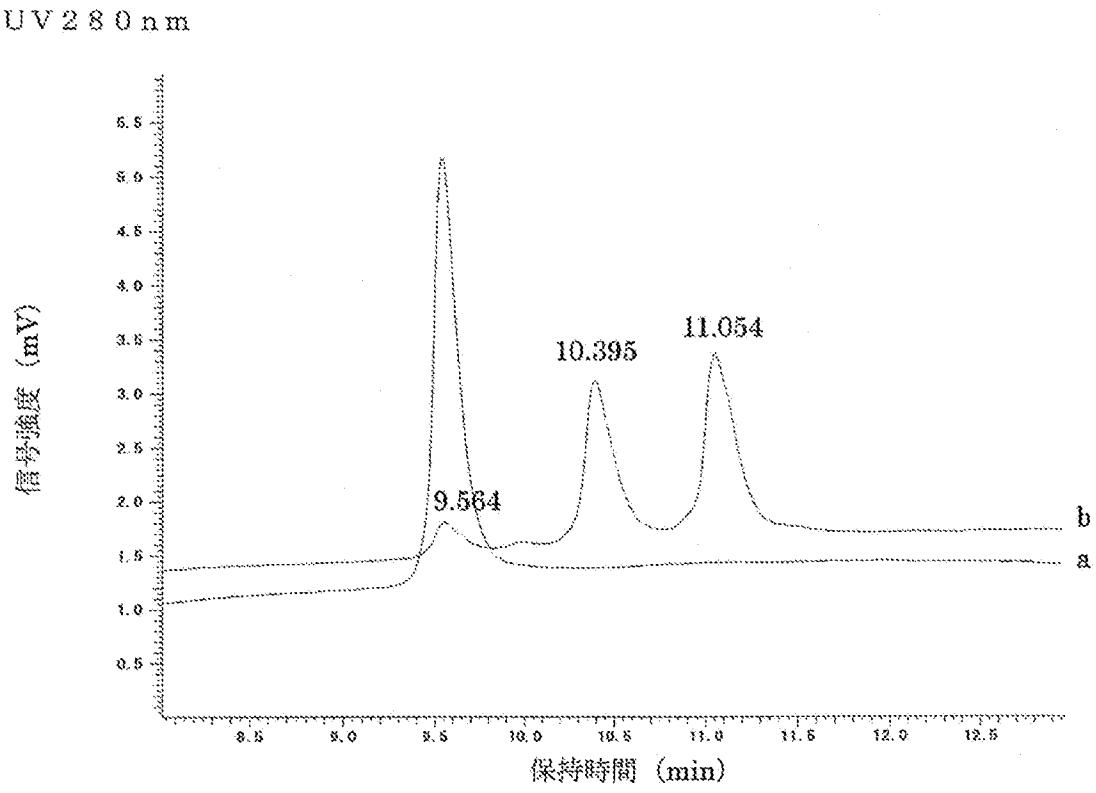

UV225nm
信号強度（mV）
10.749
11.679
a
b
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
10.849
11.782
a
b
保持時間（min）

[図36]

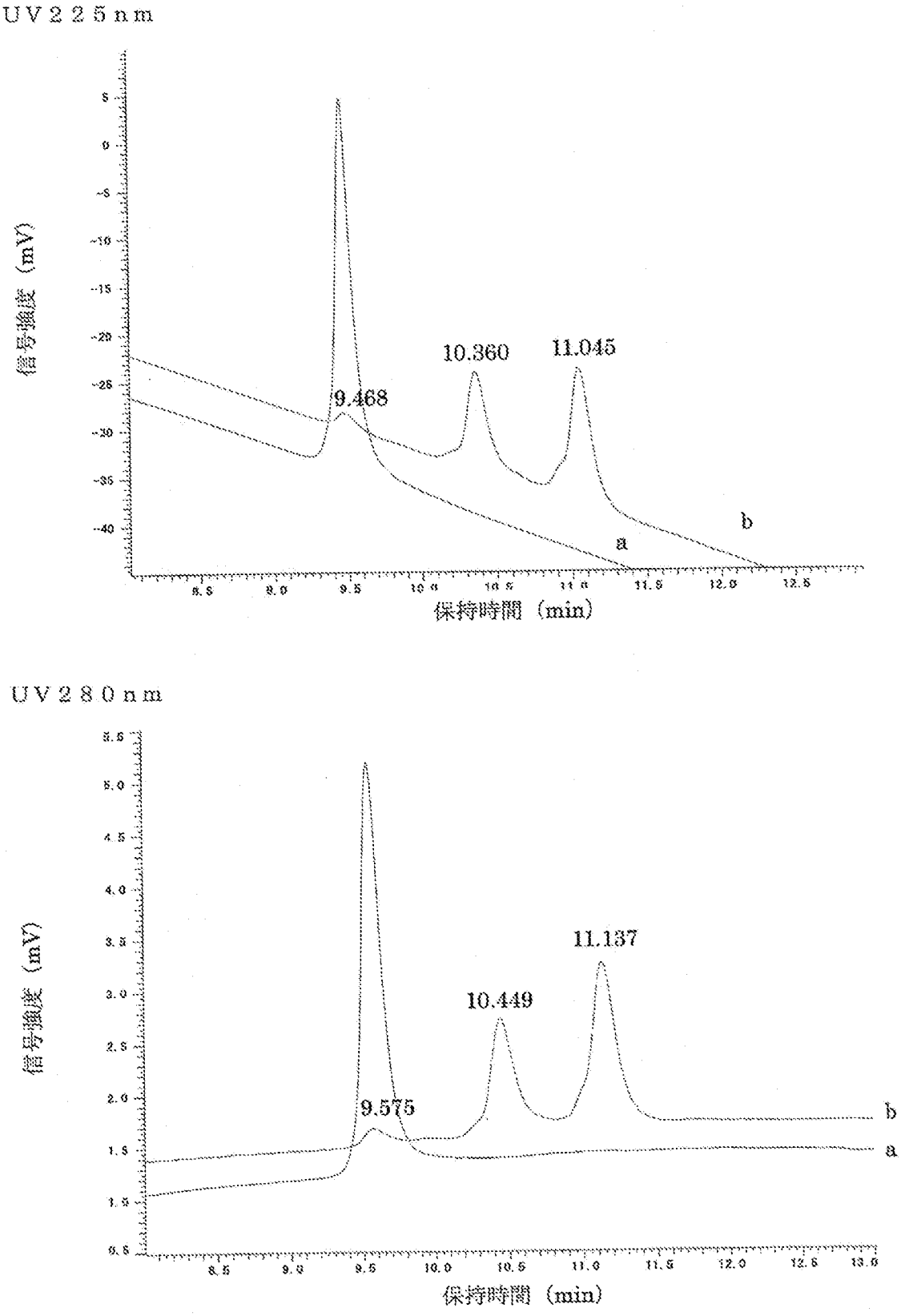

UV225nm
信号強度（mV）
11.722
10.761
a
b
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
11.807
10.849
a
b
保持時間（min）

[図37]

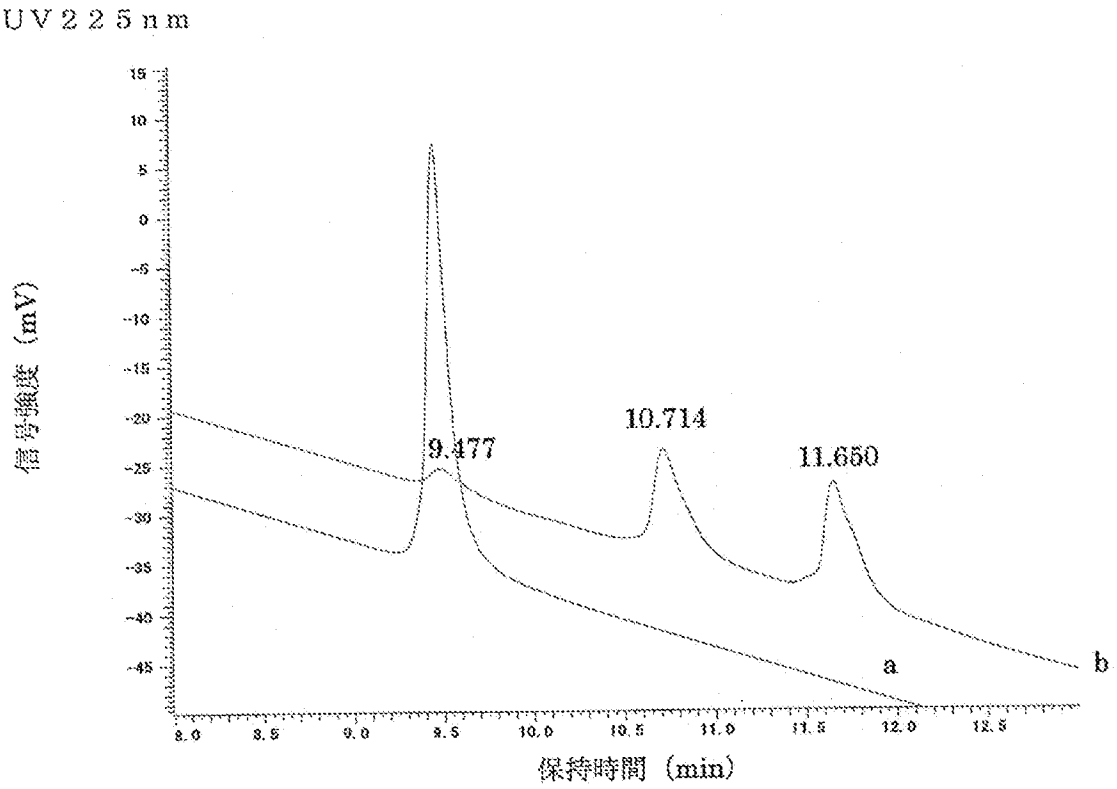

UV225nm
信号強度（mV）
10.309
10.962
9.464
a
b
保持時間（min）

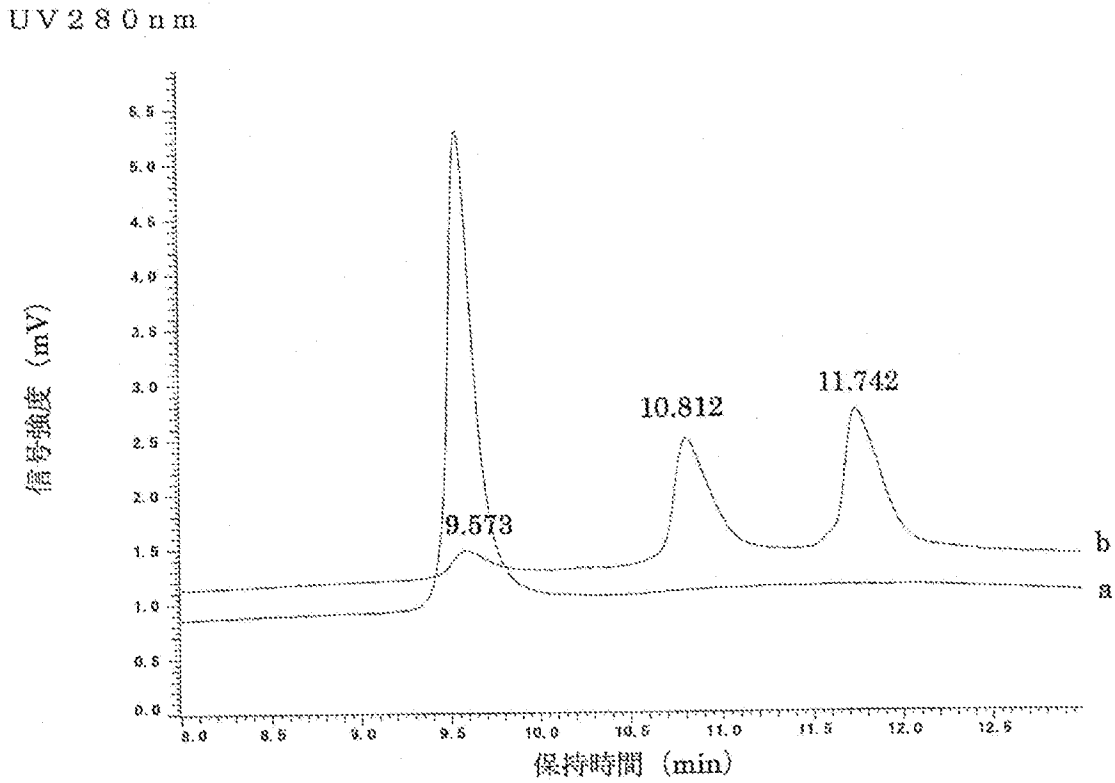

UV280nm
信号強度（mV）
10.395
11.054
9.564
b
a
保持時間（min）

[図38]

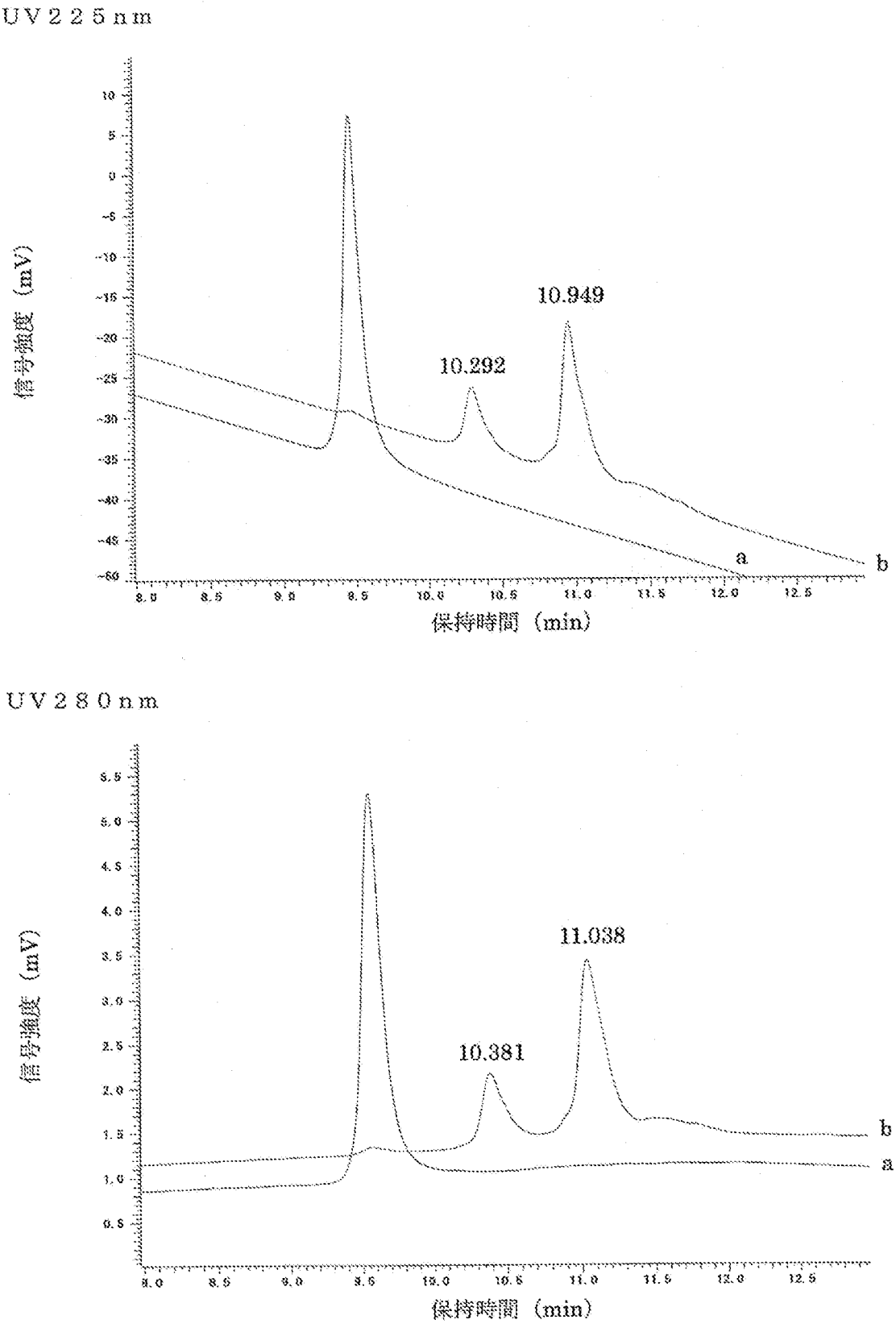

UV225nm
信号強度（mV）
10.360
11.045
9.468
b
a
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
11.137
10.449
9.575
b
a
保持時間（min）

[図39]

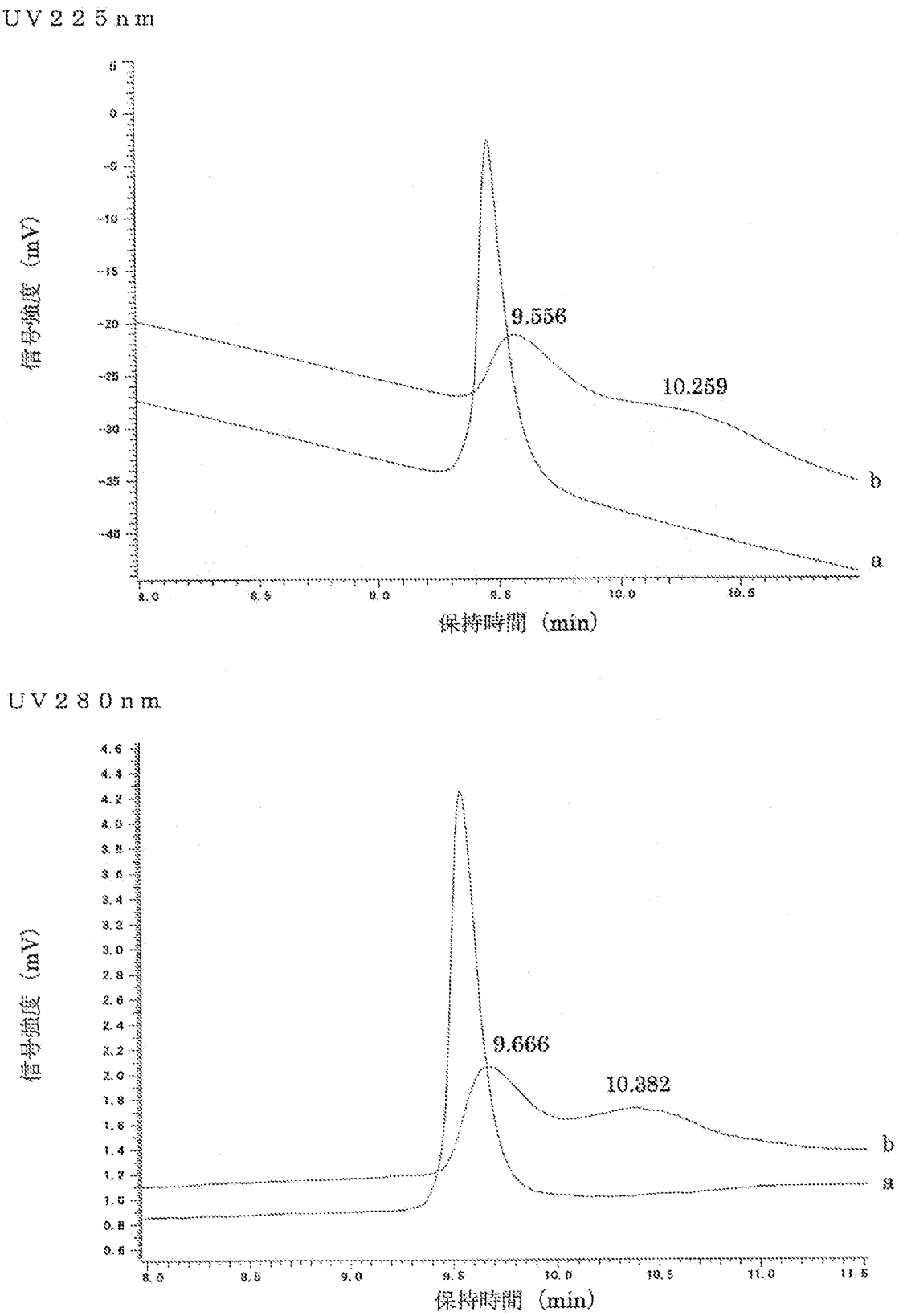

UV225nm
信号強度（mV）
9.477
10.714
11.650
a
b
保持時間（min）


UV280nm
信号強度（mV）
9.573
10.812
11.742
b
a
保持時間（min）

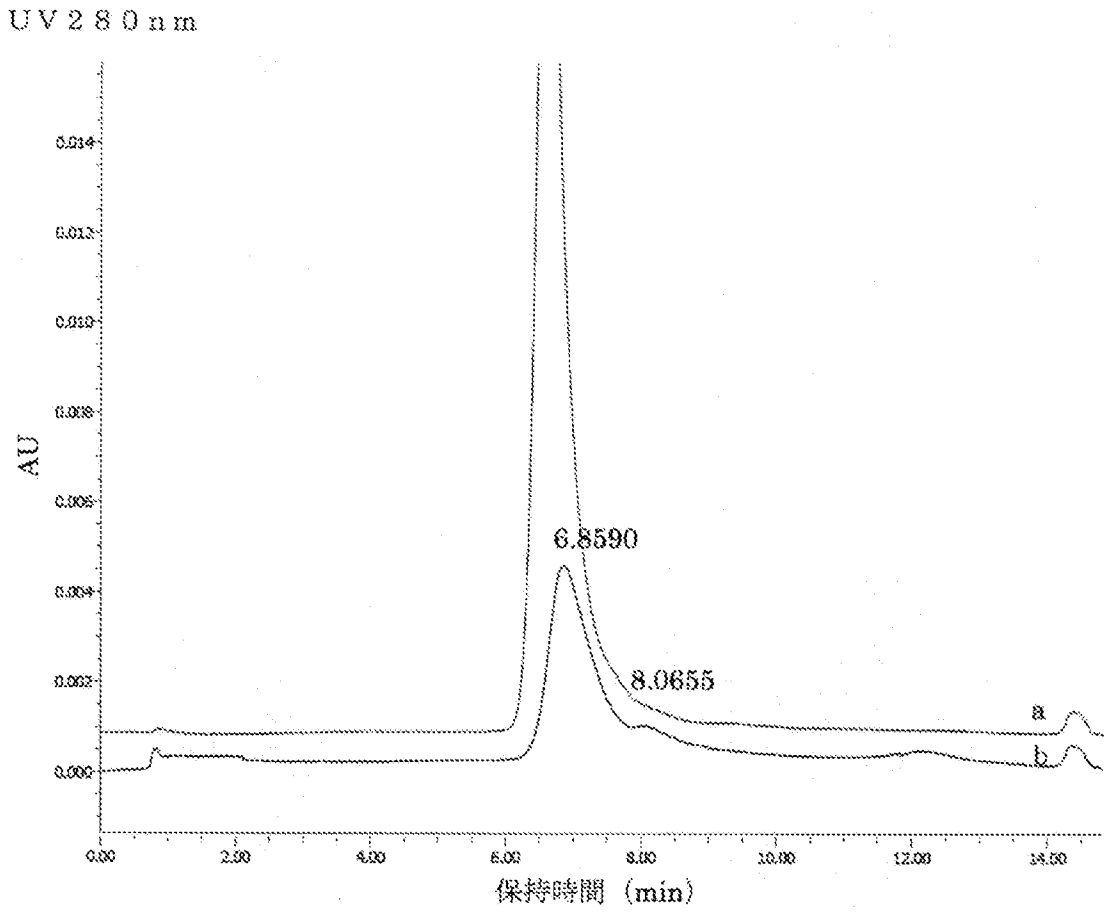
[図40]


UV225nm
信号強度（mV）
10.949
10.292
a
b
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
11.038
10.381
b
a
保持時間（min）

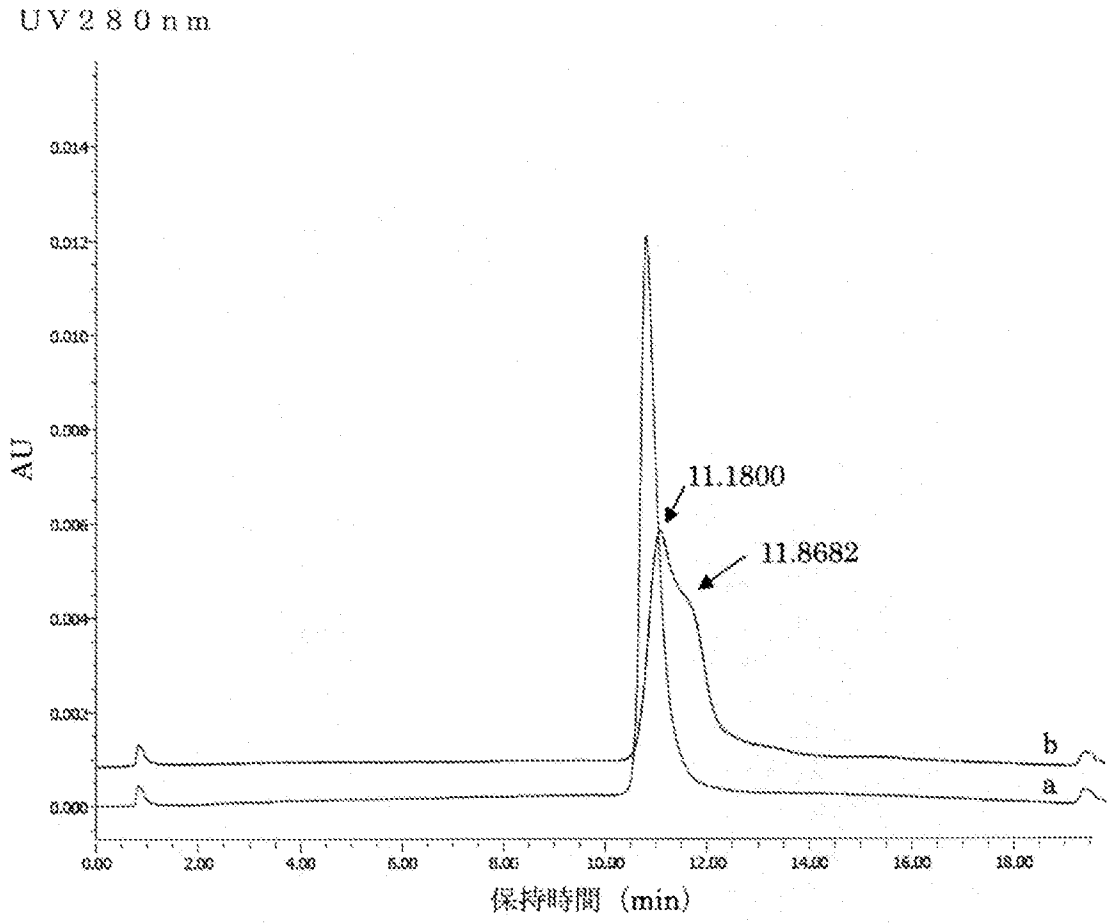
[図41]


UV225nm
信号強度（mV）
9.556
10.259
b
a
保持時間（min）
UV280nm
信号強度（mV）
9.666
10.382
b
a
保持時間（min）

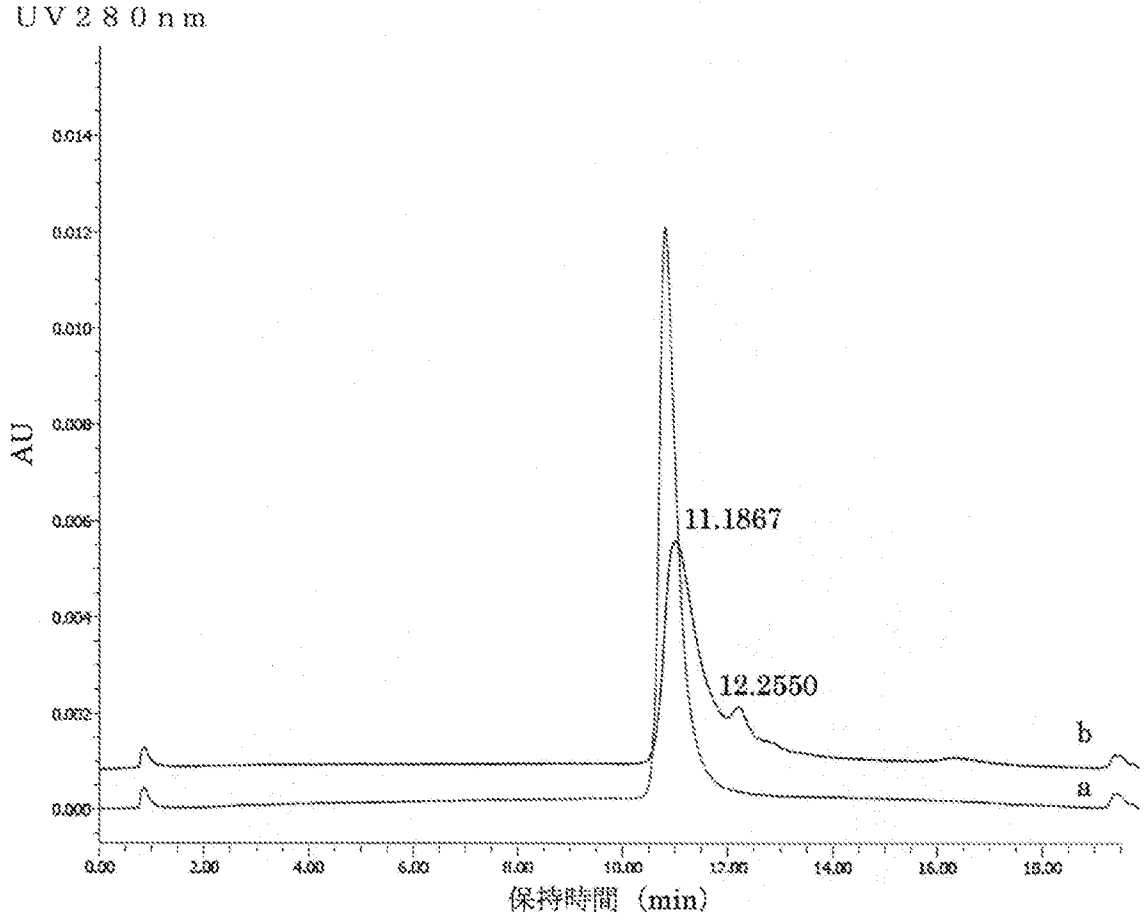
[図42]


UV280nm
AU
6.8590
8.0655
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
保持時間（min）

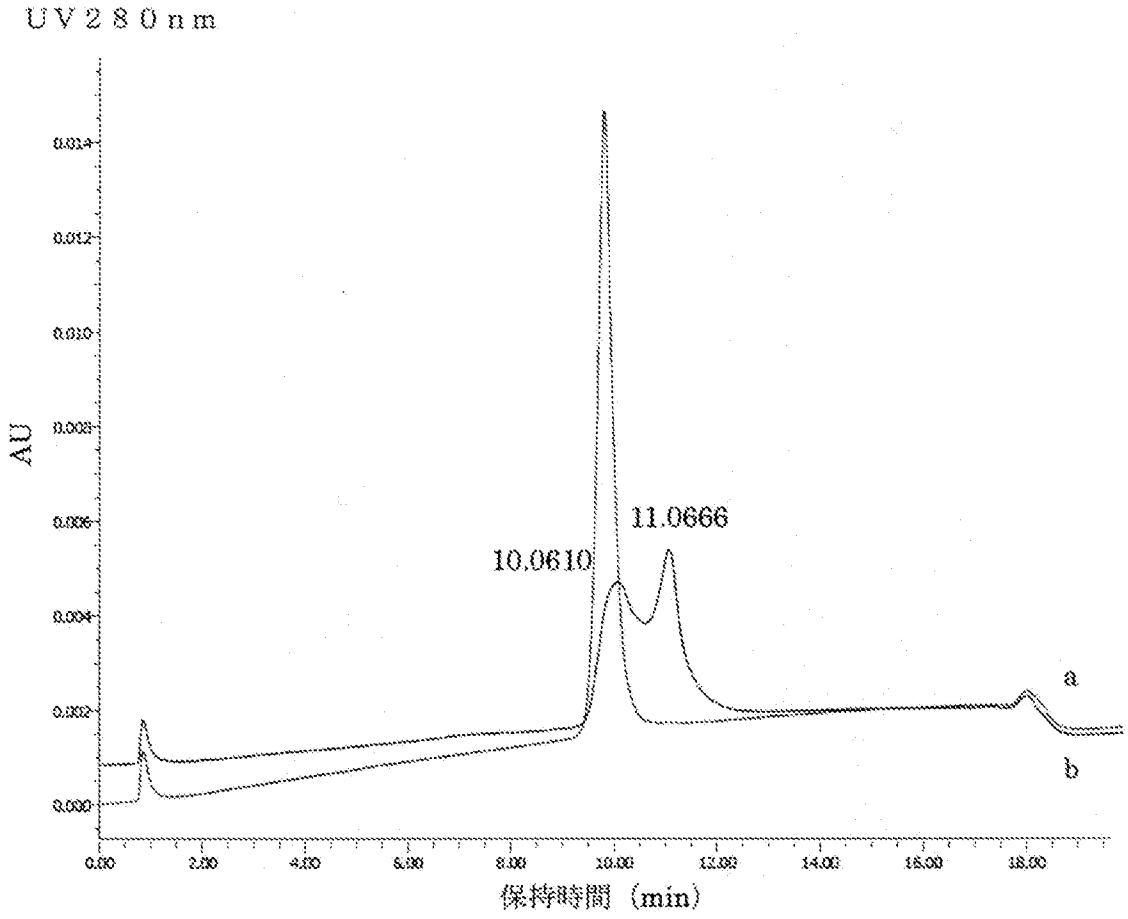
[図43]


UV280nm
AU
11.1800
11.8682
b
a
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間（min）

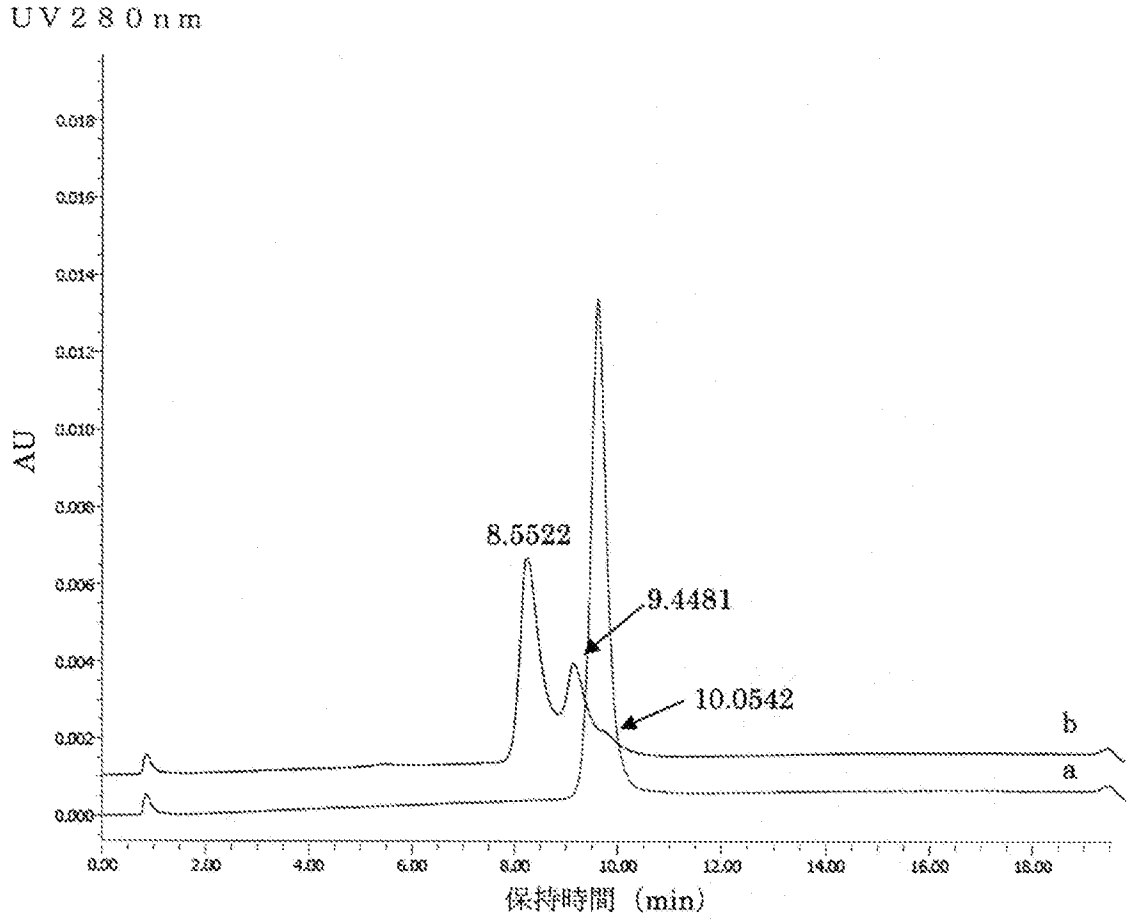
[図44]



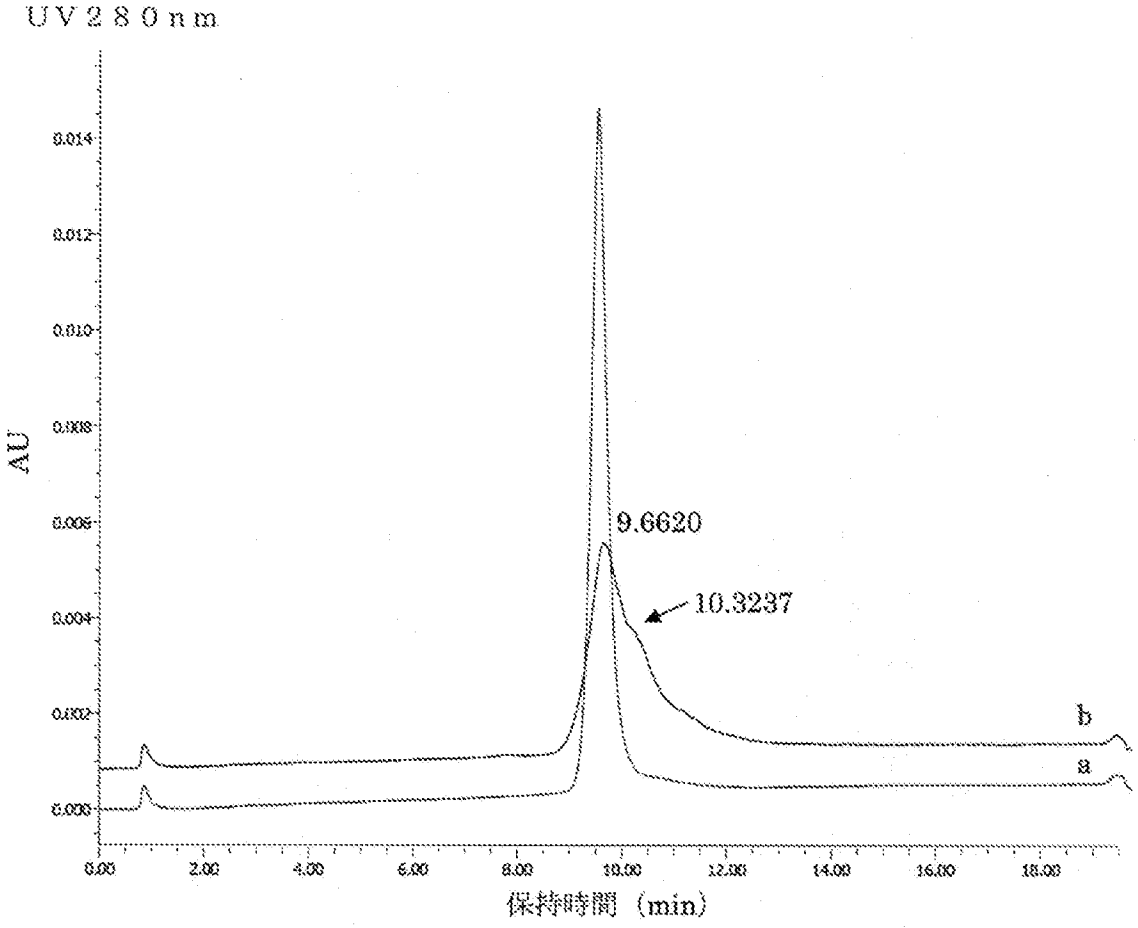
[図45]


UV280nm
AU
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
10.0610
11.0666
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間 (min)

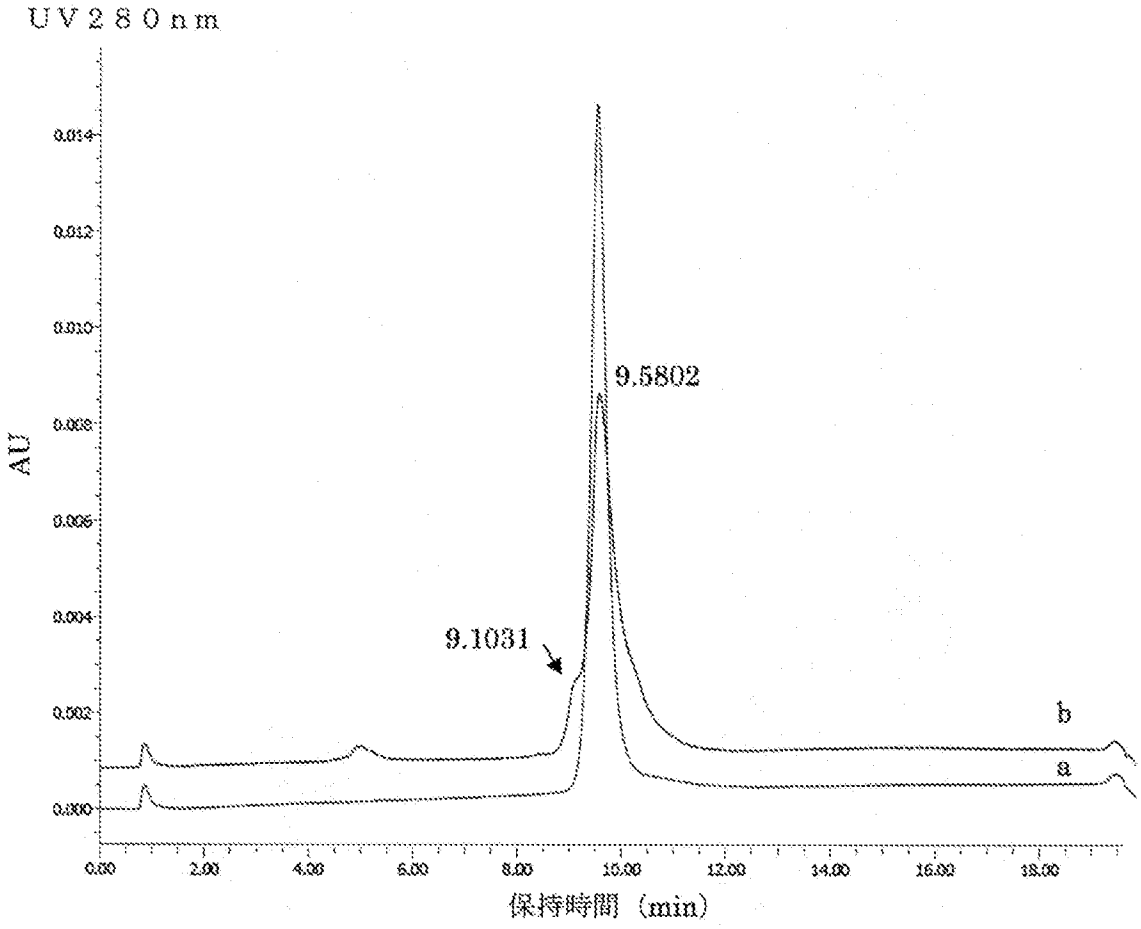
[図46]



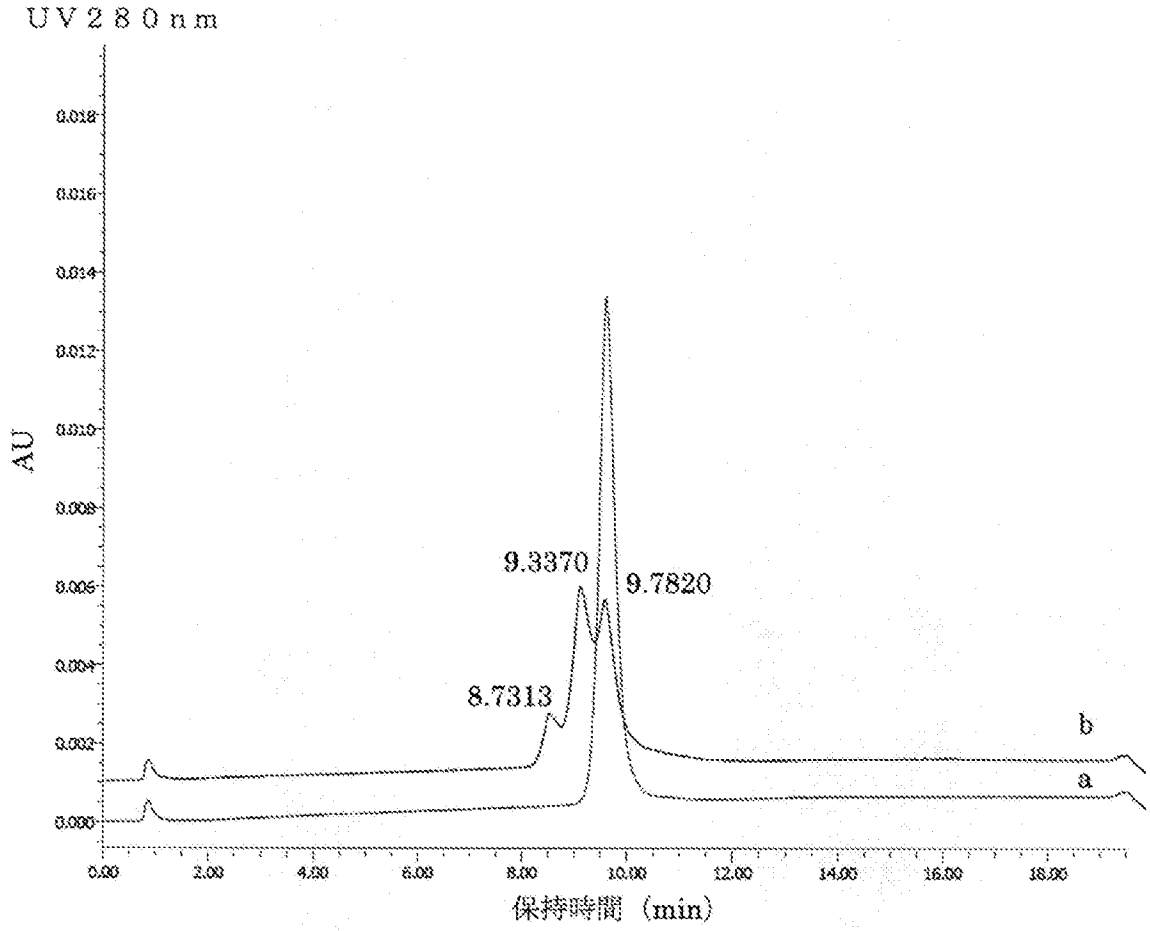
[図47]


UV280nm
AU
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
9.6620
10.3237
b
a
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間（min）

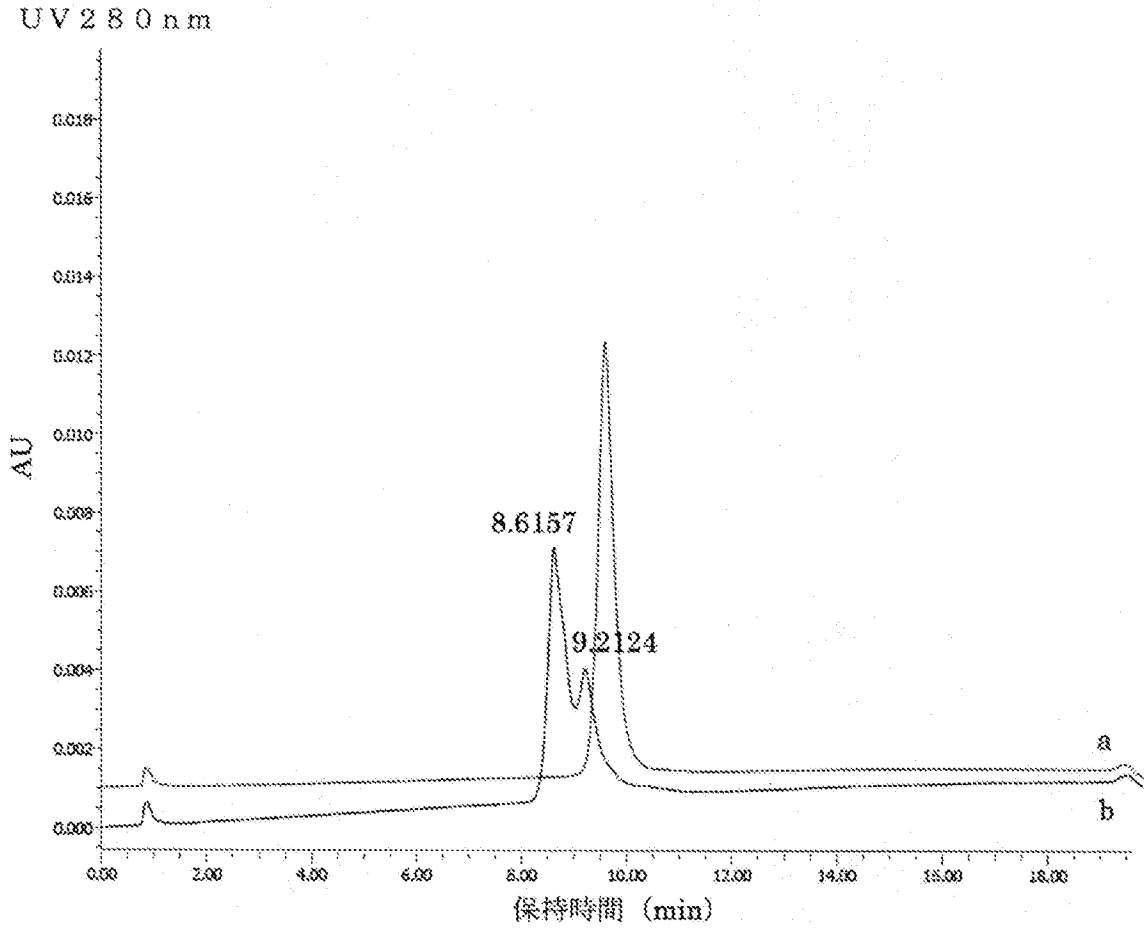
[図48]


UV280nm
AU
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
9.5802
9.1031
b
a
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間（min）

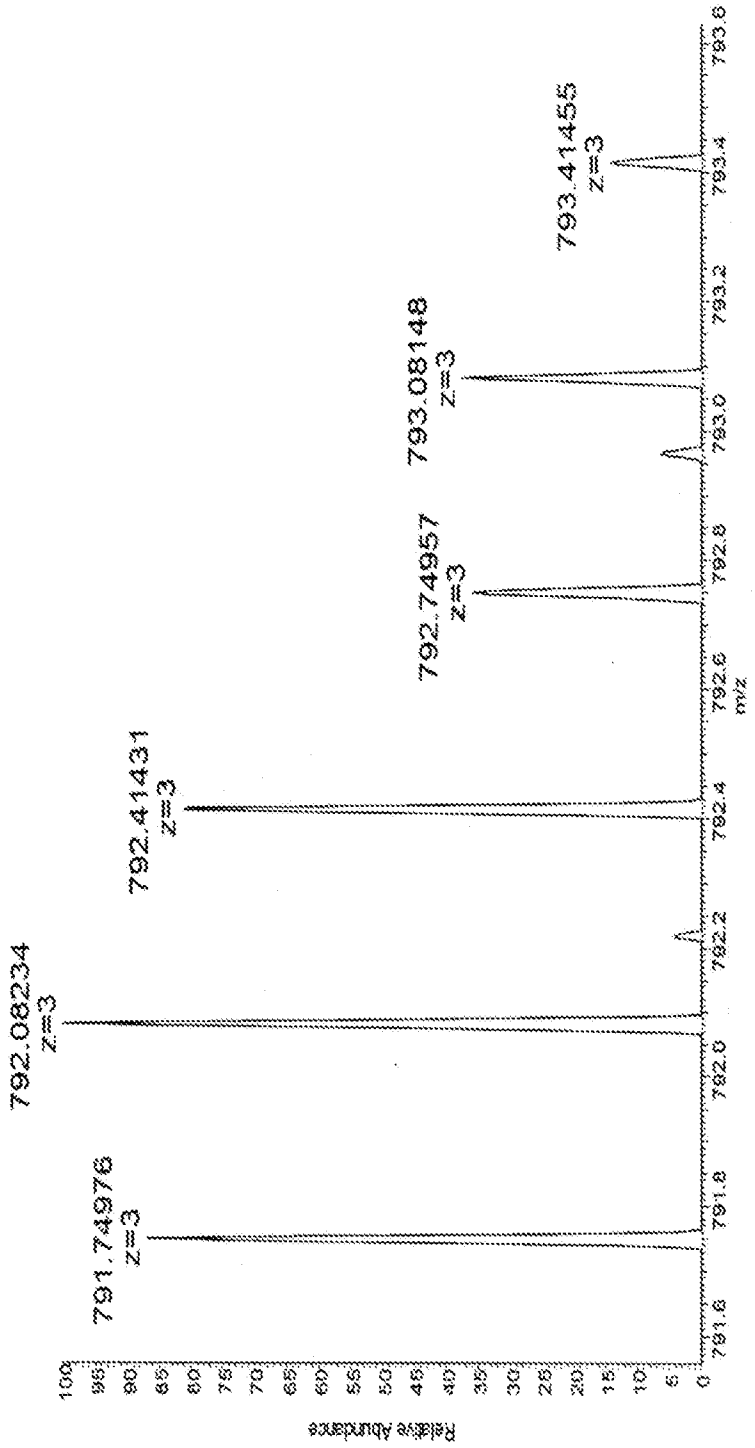
[図49]


UV280nm
AU
0.018
0.016
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
9.3370
9.7820
8.7313
b
a
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間 (min)

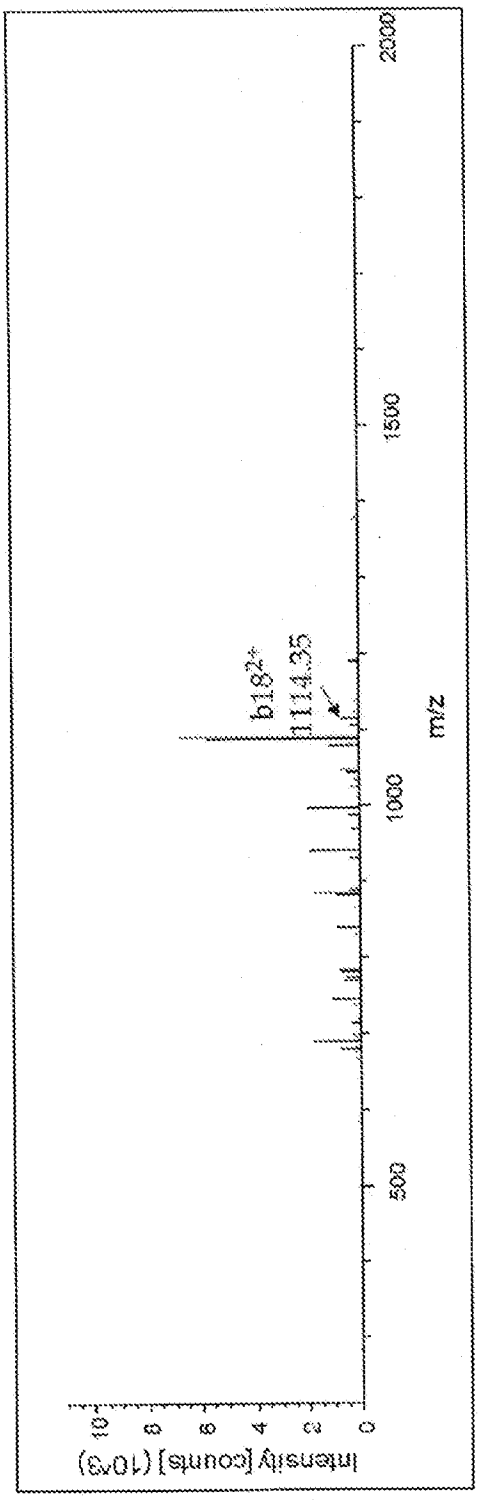
[図50]



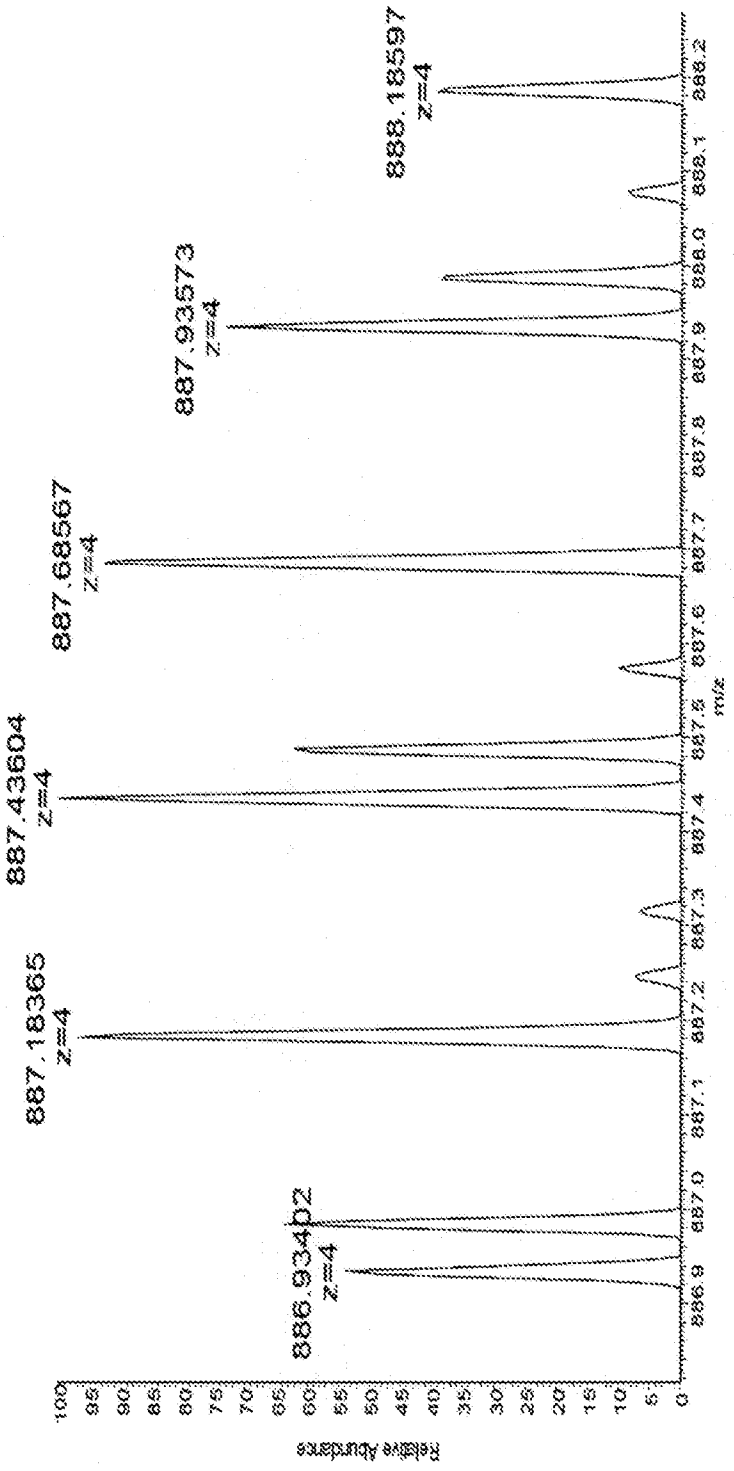
[図51]


791.74976
z=3
792.08234
z=3
792.41431
z=3
792.74957
z=3
793.08148
z=3
793.41455
z=3
Relative Abundance
m/z

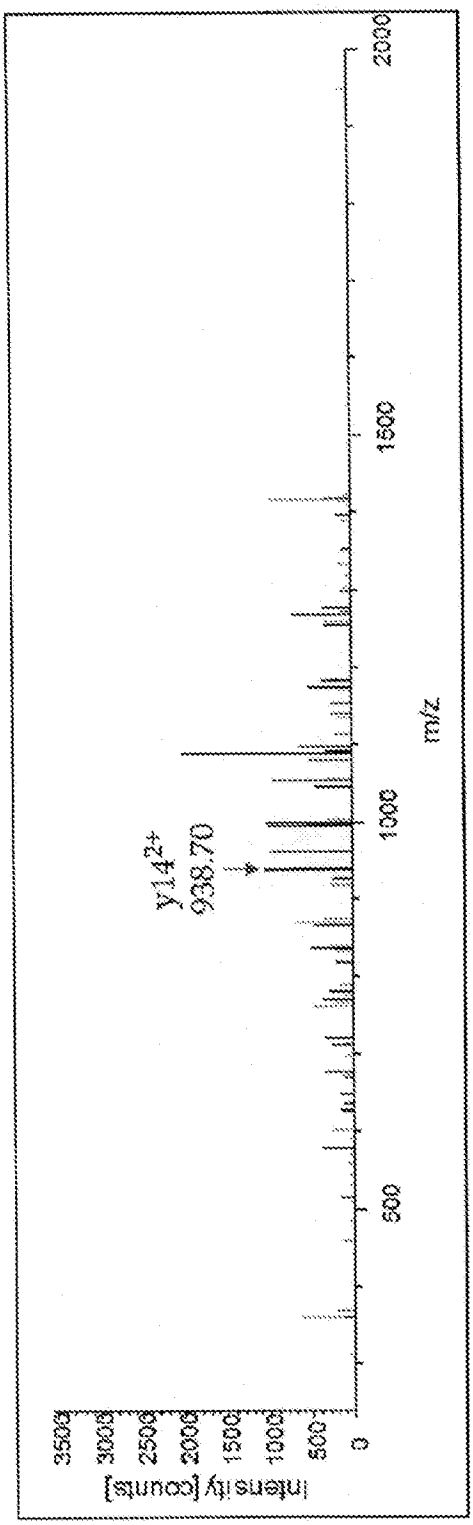
[図52]


b18^{2+}
1114.35
m/z
2000
1500
1000
500
Intensity [counts] (10^3)
10
8
6
4
2
0

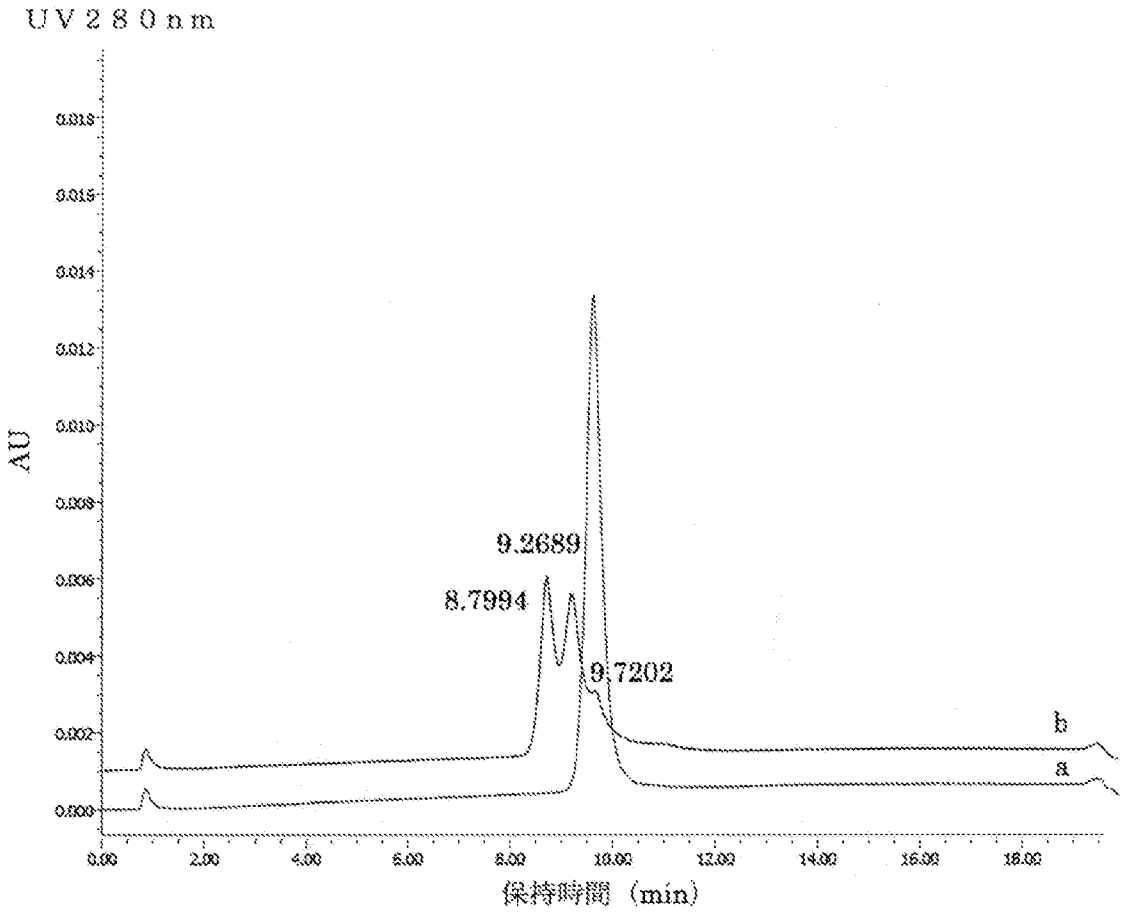
[図53]


888.18597
z=4
887.93573
z=4
887.68567
z=4
887.43604
z=4
887.18365
z=4
886.93402
z=4
Relative Abundance
m/z

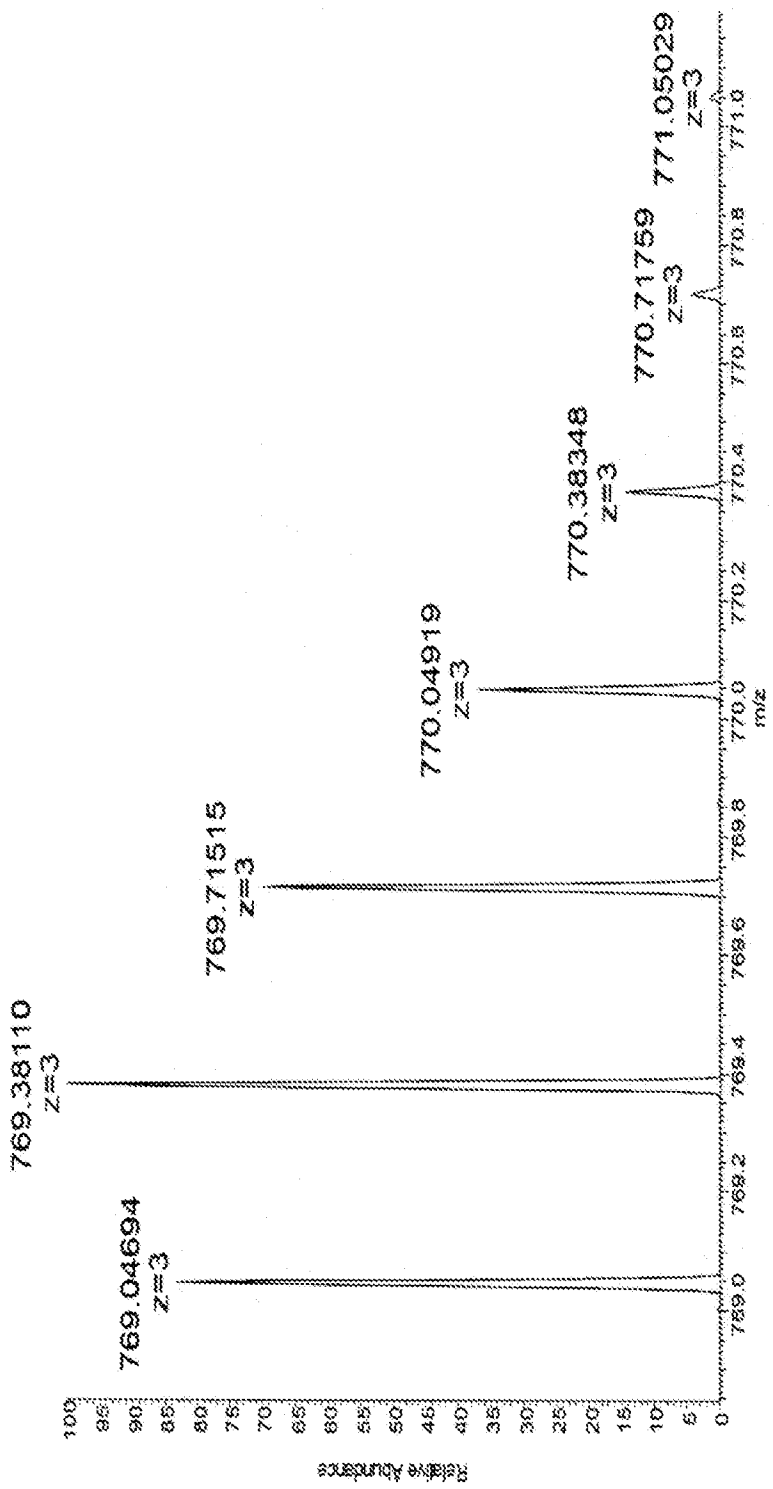
[図54]


y14²⁺
938.70
m/z
intensity [counts]
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500

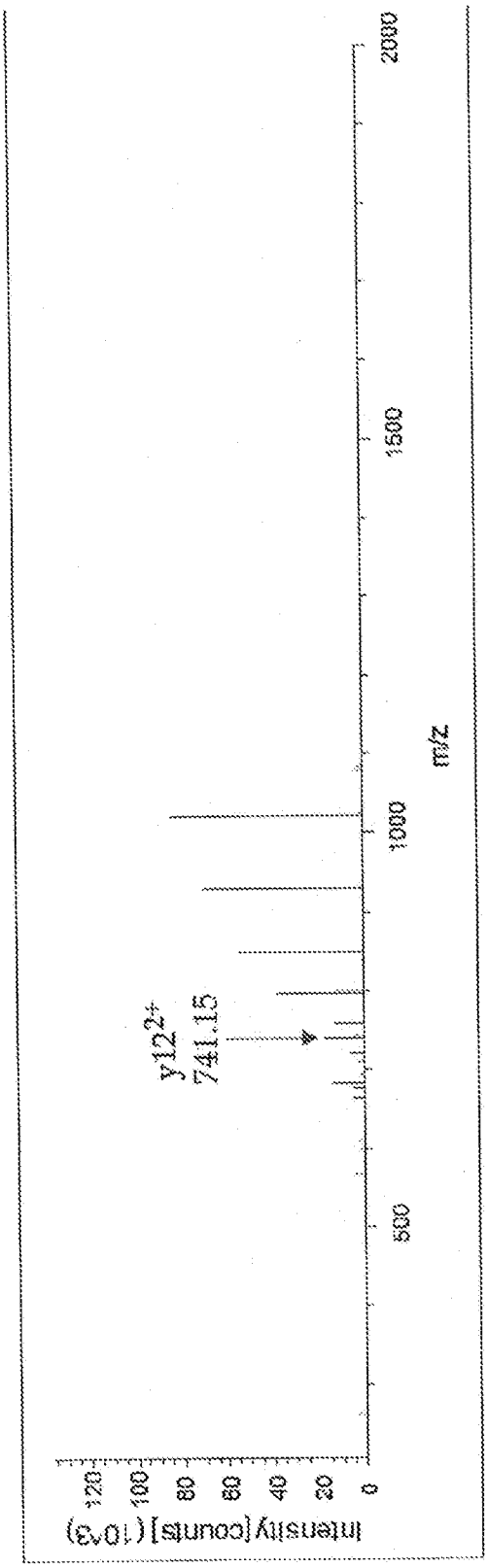
[図55]



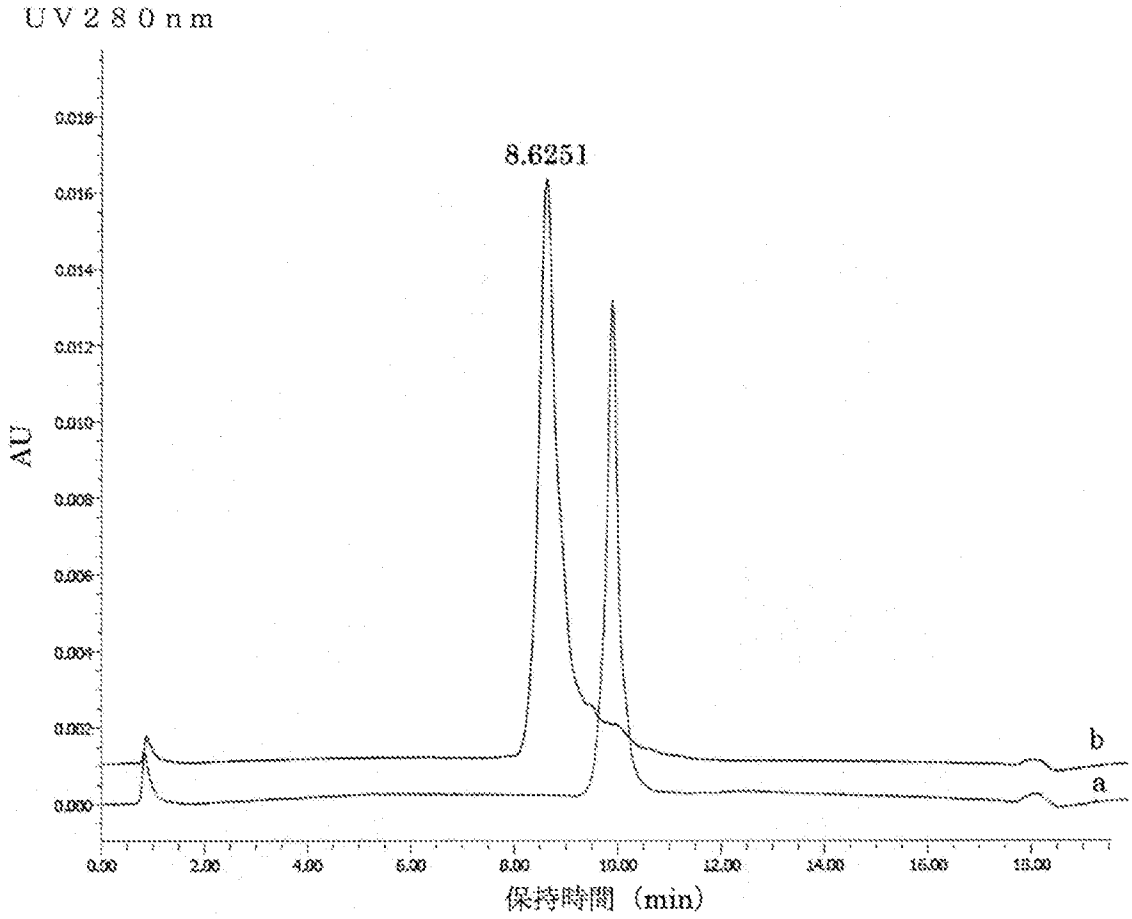
[図56]


769.04694
z=3
769.38110
z=3
769.71515
z=3
770.04919
z=3
770.38348
z=3
770.71759
z=3
771.05029
z=3
m/z
Relative Abundance

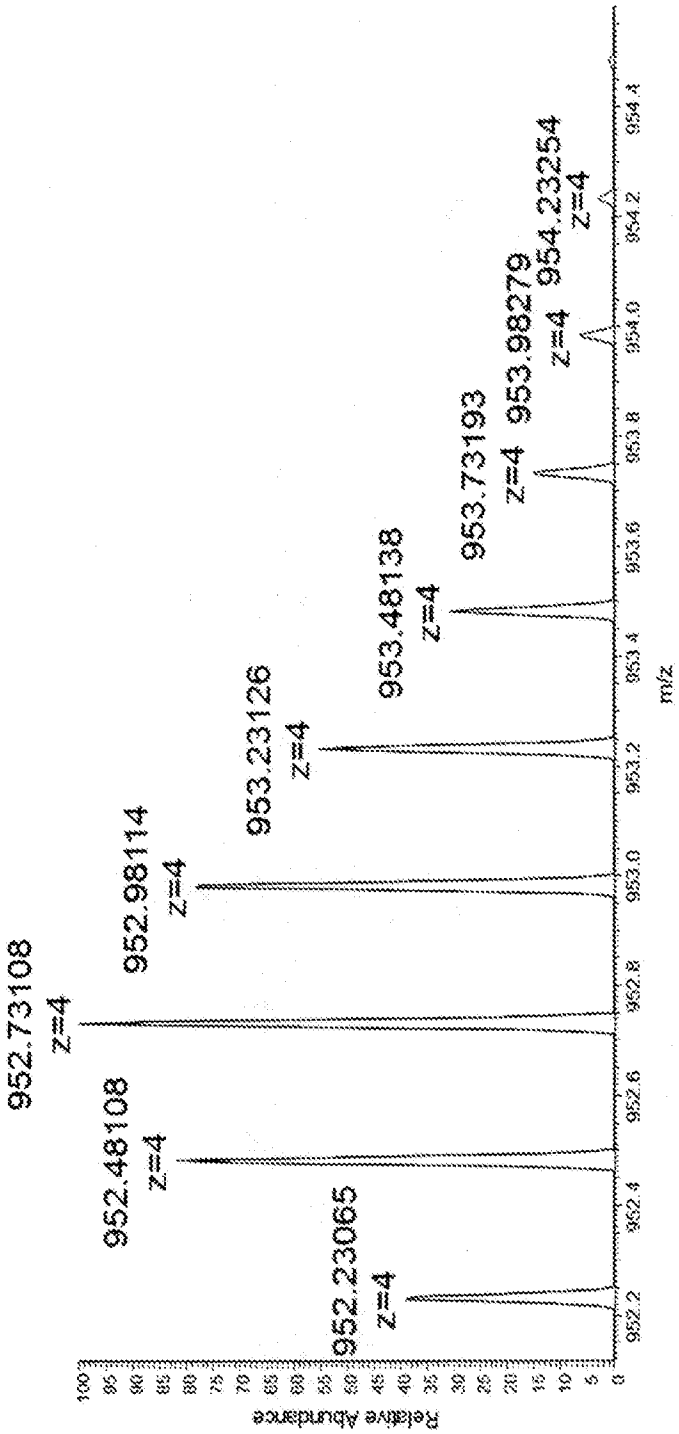
[図57]


Intensity [counts] (10^3)
120
100
80
60
40
20
0
500
1000
1500
2000
m/z
y12 2+
741.15

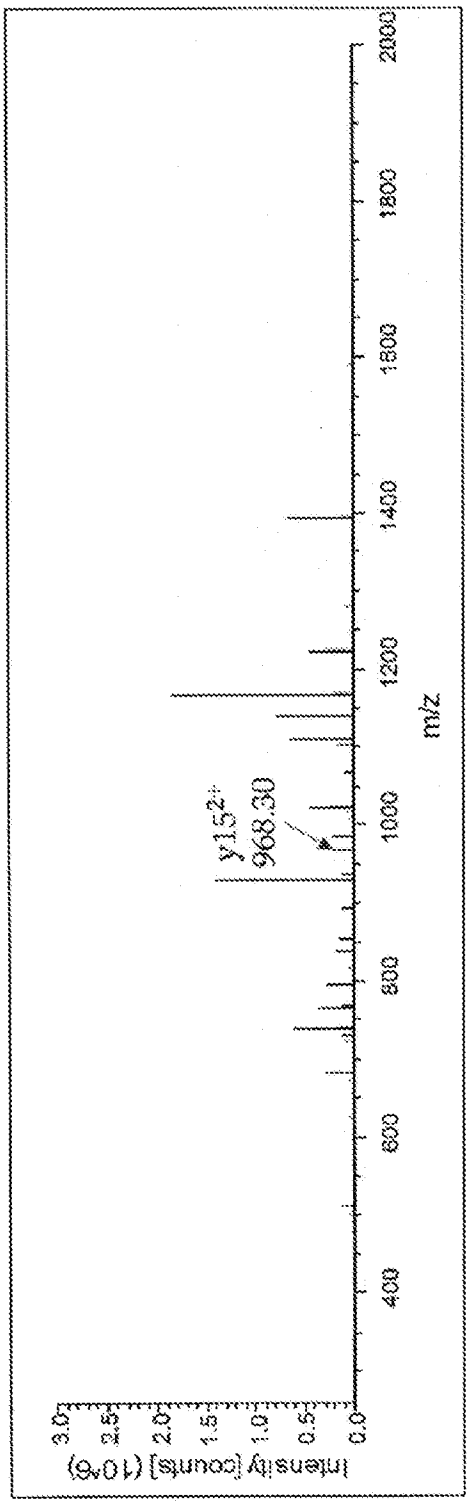
[図58]


UV280nm
8.6251
AU
0.018
0.016
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
b
a
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間（min）

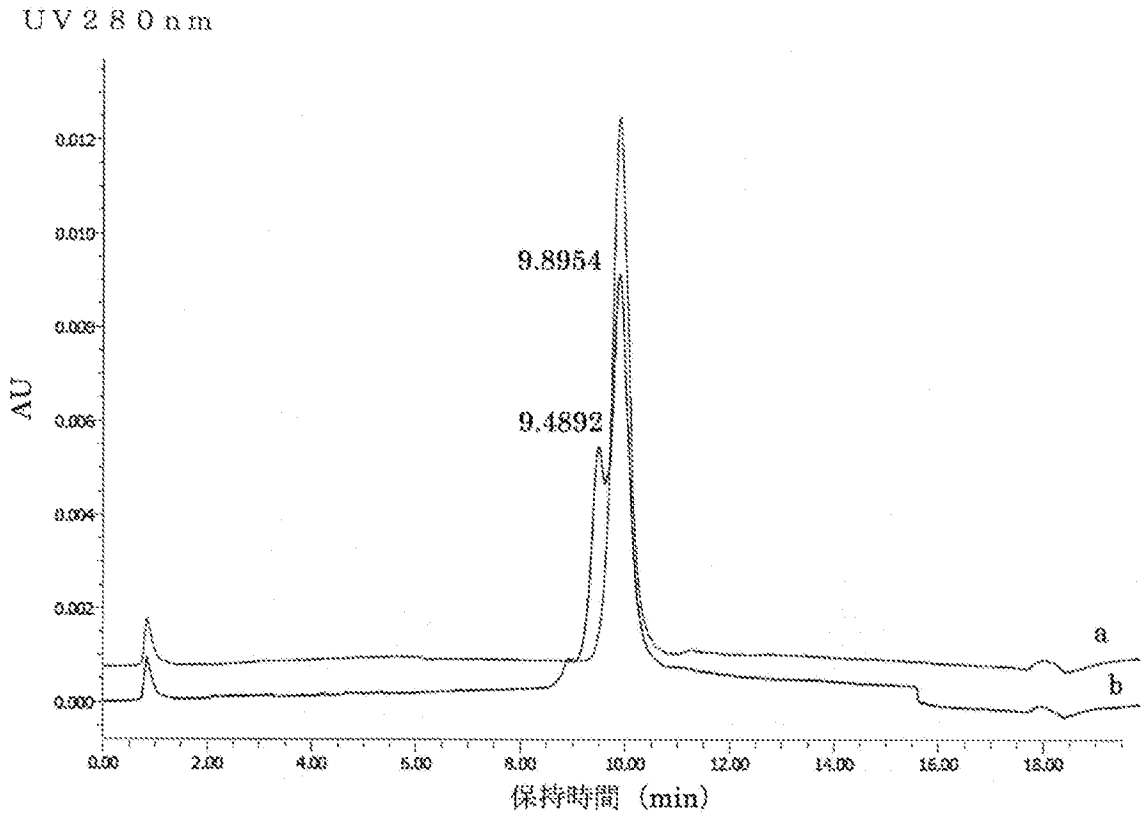
[図59]


952.73108
z=4
952.98114
z=4
953.23126
z=4
953.48138
z=4
953.73193
z=4
953.98279
z=4
954.23254
z=4
952.48108
z=4
952.23065
z=4
Relative Abundance
m/z

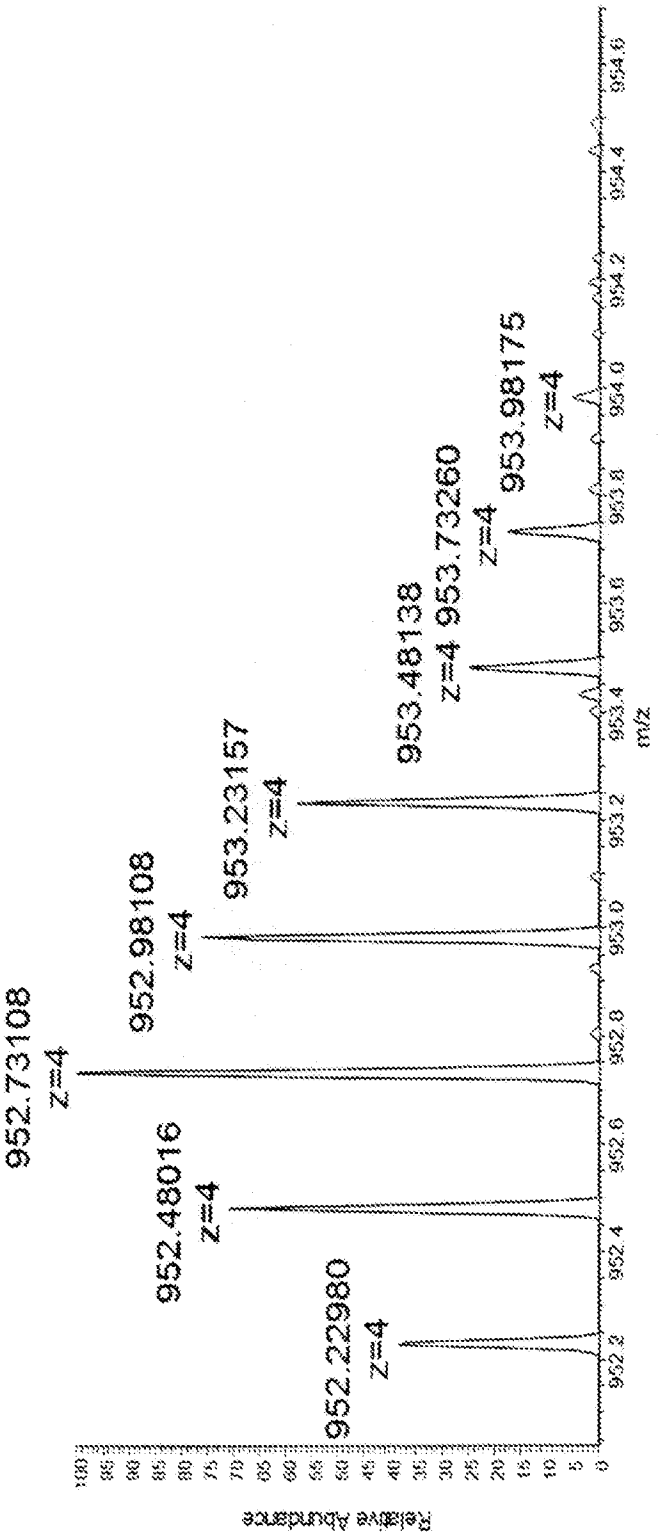
[図60]


y15²⁺
968.30
m/z
Intensity [counts] (10^6)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

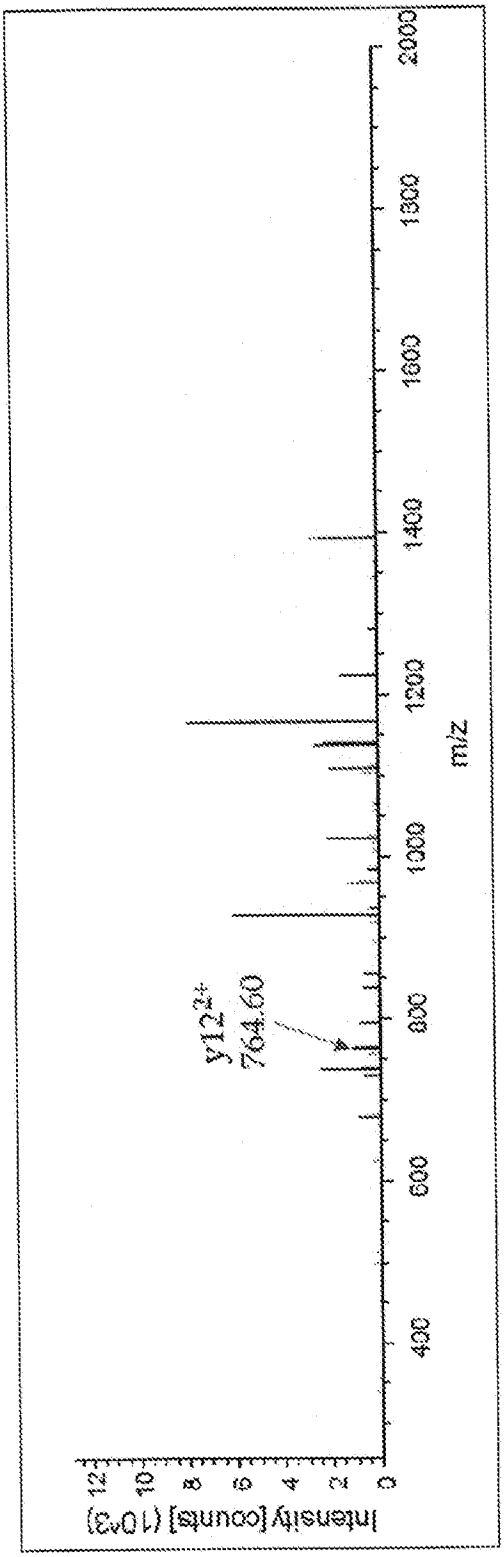
[図61]


UV280nm
AU
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
9.8954
9.4892
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間 (min)

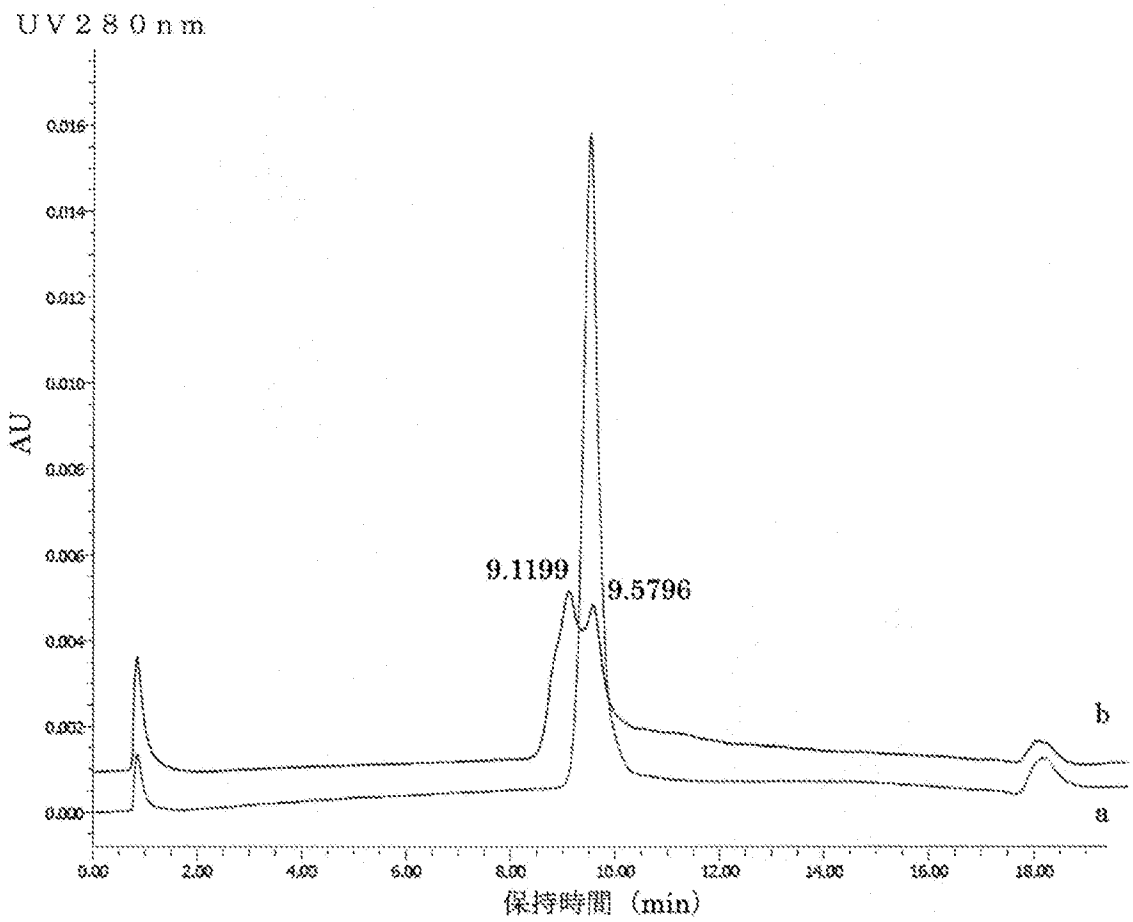
[図62]


952.73108
z=4
952.98108
z=4
953.23157
z=4
953.48138
z=4
953.73260
z=4
953.98175
z=4
952.48016
z=4
952.22980
z=4
m/z
Relative Abundance

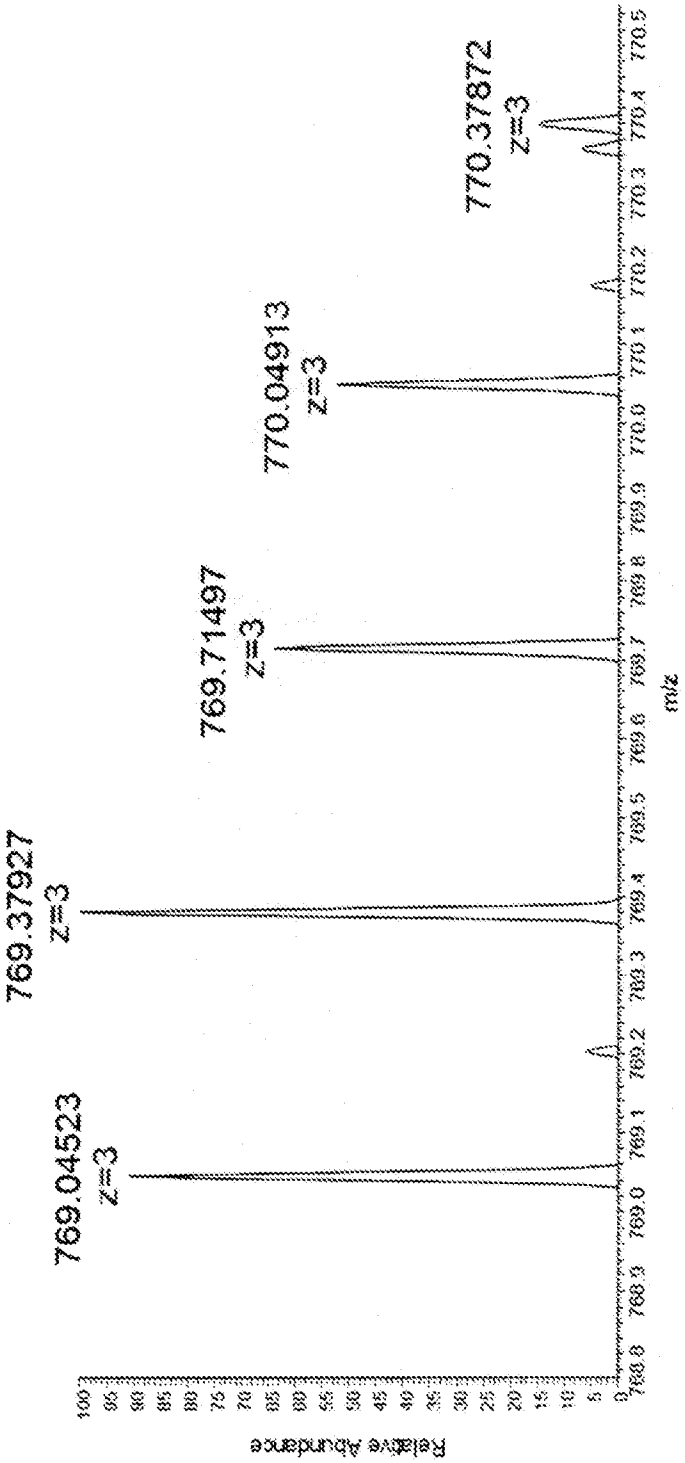
[図63]


Intensity [counts] (10^3)
0
2
4
6
8
10
12
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
y12^2+
764.60

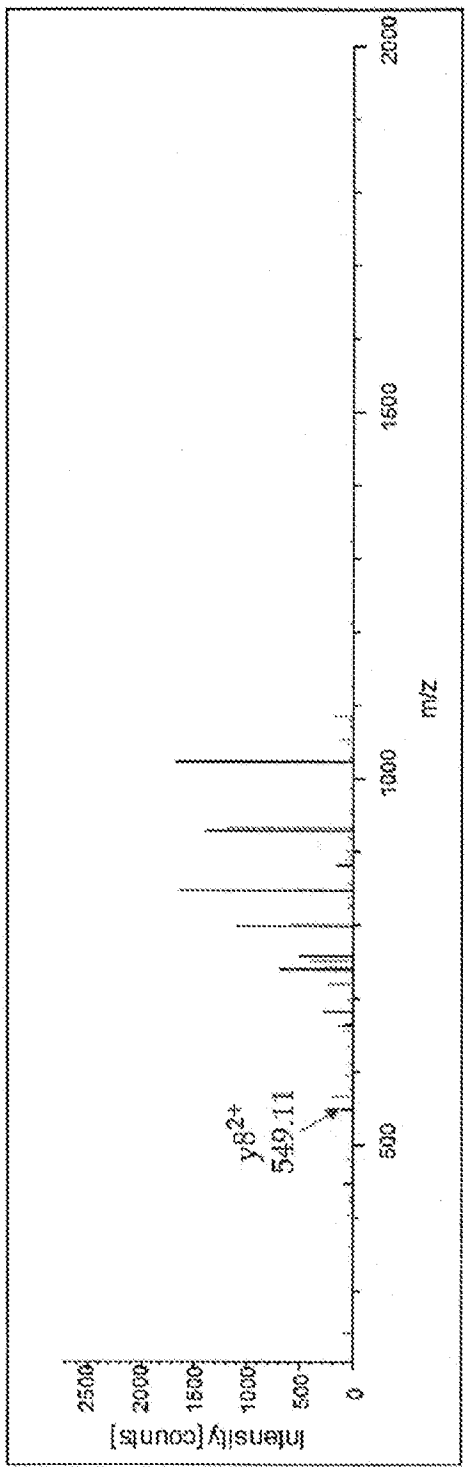
[図64]



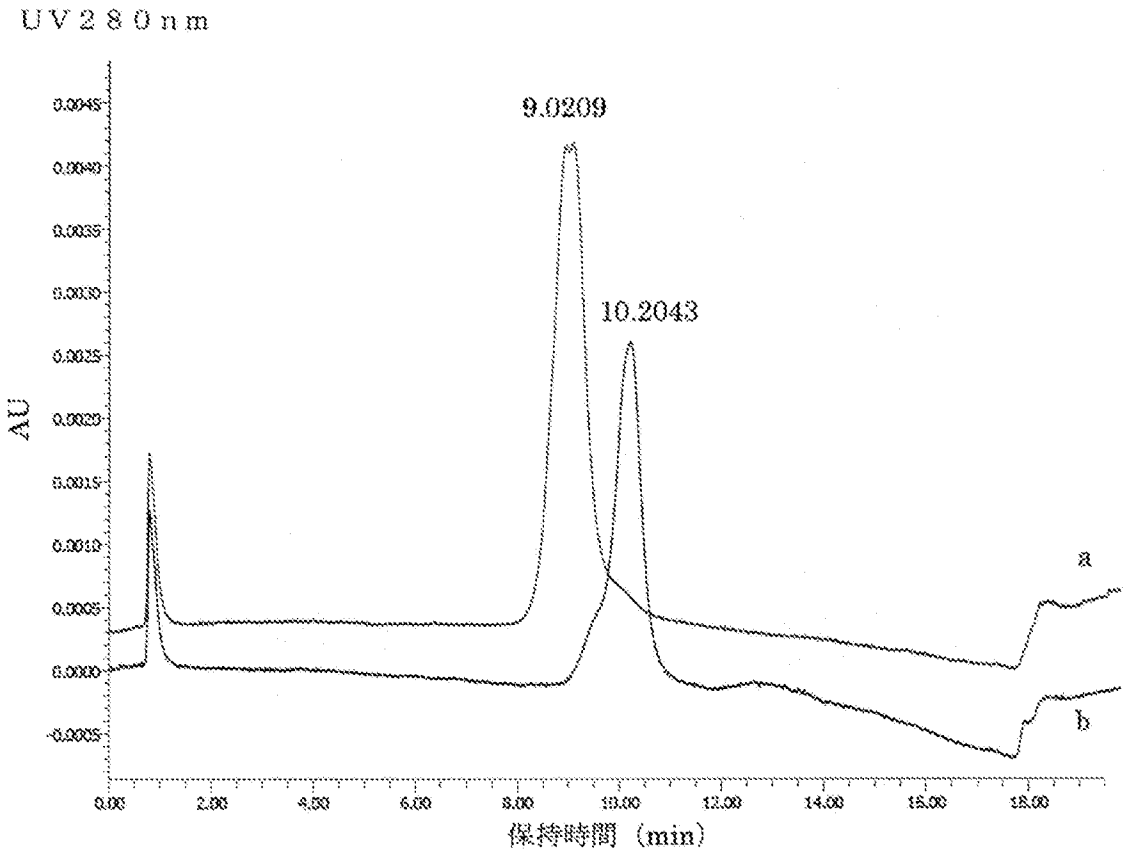
[図65]


769.04523
z=3
769.37927
z=3
769.71497
z=3
770.04913
z=3
770.37872
z=3
Relative Abundance
m/z

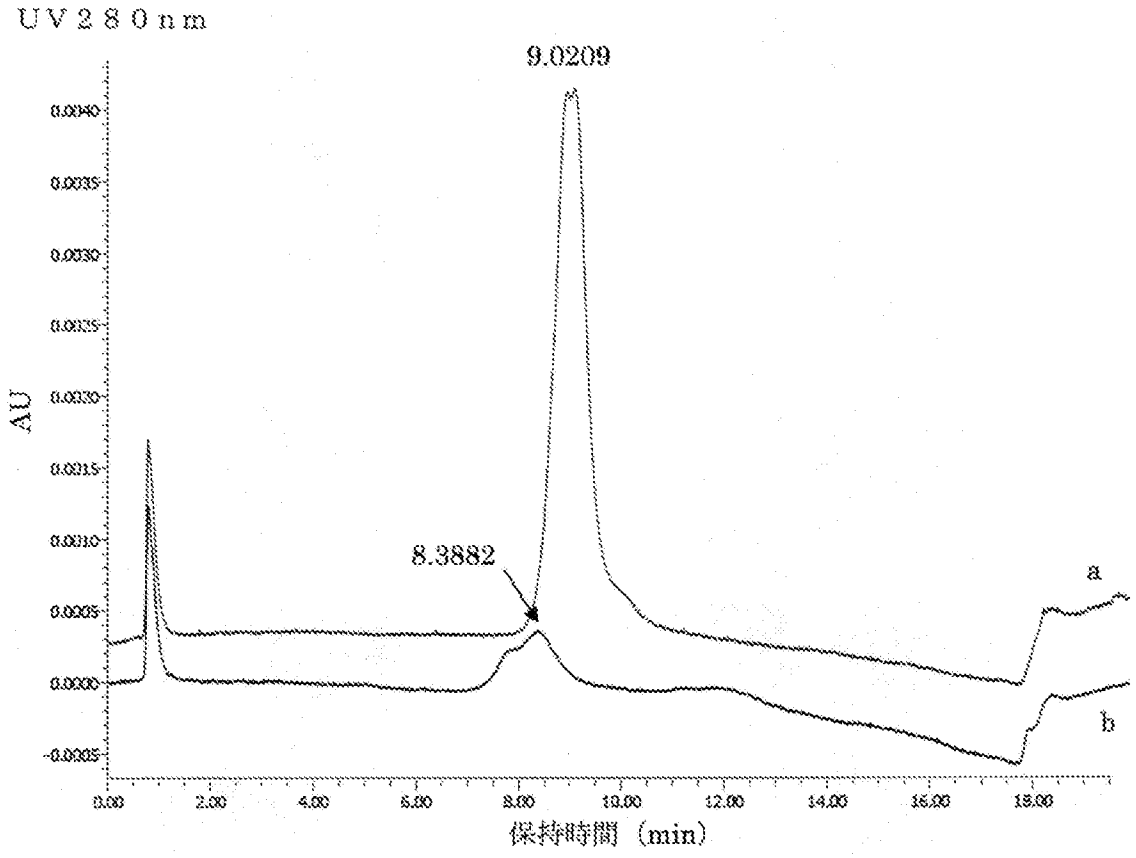
[図66]


Intensity[counts]
2500
2000
1500
1000
500
0
500
1000
1500
2000
m/z
y8 2+
549.11

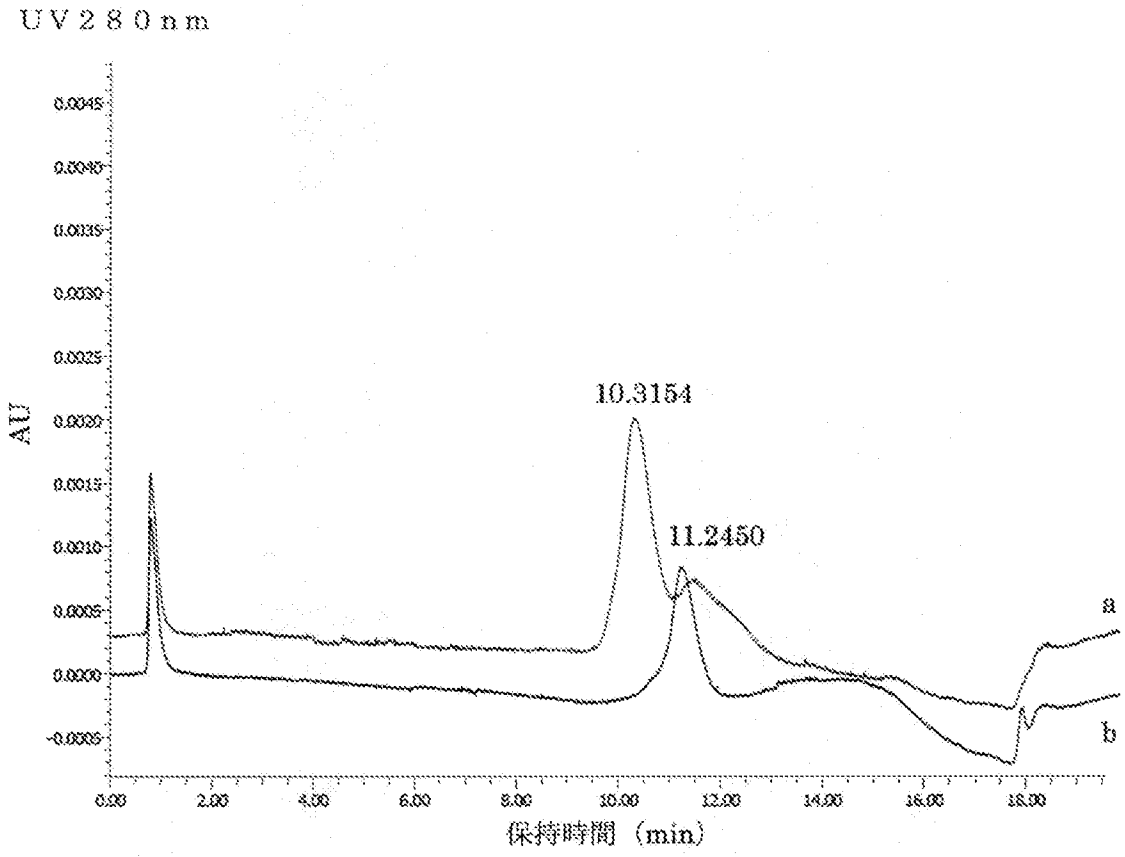
[図67]


UV280nm
9.0209
10.2043
AU
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間 (min)

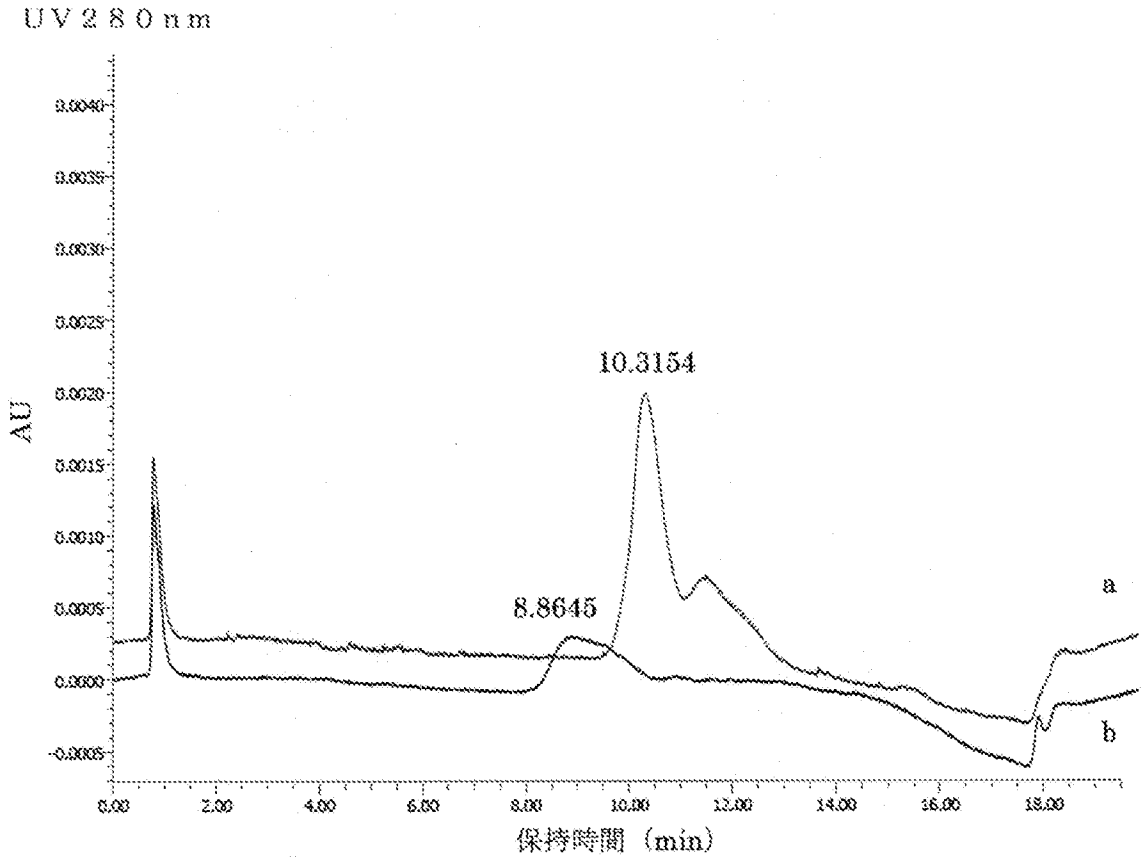
[図68]


UV280nm
9.0209
8.3882
a
b
AU
0.0040
0.0035
0.0030
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
-0.0005
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間 (min)

[図69]


UV280nm
AU
0.0045
0.0040
0.0035
0.0030
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
-0.0005
10.3154
11.2450
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間（min）

[図70]


UV280nm
AU
0.0040
0.0035
0.0030
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
-0.0005
10.3154
8.8645
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
保持時間（min）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/017345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07K19/00(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C07K19/00, C07K16/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - A	WO 2015/191883 A1 (DOPHEN BIOMEDICAL) 17 December 2015, claims, fig. 4, 5, 18, paragraphs [0127]-[0133], examples 6, 8 & EP 3154574 A1 & JP 2017-519045 A, claims, fig. 4, 5, 18, paragraphs [0112]-[0118], examples 6, 8	112, 115 - 1-111, 113, 114, 116, 117
A	WO 2016/186206 A1 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) 24 November 2016, claims & EP 3299383 A1	1-117

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 July 2018 (26.07.2018)	07 August 2018 (07.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	TSUCHIKAMA, K., et al., "Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries", Protein Cell, January 2018, vol. 9, no. 1, pp. 33-46	1-117
P, A	WO 2017/191817 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 09 November 2017, claims (Family: none)	1-117
P, A	WO 2017/217347 A1 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) 21 December 2017, claims (Family: none)	1-117
P, A	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, February edition, no. 755, pp. 22-24, non-official translation (ITO, Yuji et al., "Development of radiopharmaceuticals using antibody site-specific modification method")	1-117

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/017345

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

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

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

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

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

(Continuation of Box III on page 1)

Claim 1 has the special technical feature of a "compound comprising a substance having an affinity for a soluble protein represented by A-L-B-R, a cleavable linker which is a divalent group containing a cleavable moiety, a bivalent group with or without a bioorthogonal functional group, and a group reactive to the soluble protein, or a salt thereof", and thus is classified as invention 1.

In addition, claims 2-111, 113, 114, 116, and 117 are dependent on claim 1, or are substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1, and thus can be classified as invention 1.

Claim 112 shares the technical feature of a compound comprising a bioorthogonal functional group and a potion of R (corresponding to a linker not including the peptide moiety of claim 12, for example, a C=O group adjacent to the bioorthogonal functional group of the present application [FIG. 1-1]), or a salt thereof with claim 1 classified as invention 1.

However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure (for example, the moiety of 1 C(=O)-CH2-CH2-CH2C(=O)-SH of the thioacid described in Example 1 (the SH group corresponding to the bioorthogonal functional group)) of document 1 (Japanese Unexamined Patent Application Publication (Translation of PCT Application) No. 2012-512845), and thus cannot be said to be a special technical feature.

In addition, there do not exist other identical or corresponding special technical features between claim 112 and claim 1.

In addition, claim 112 is not dependent on claim 1. In addition, claim 112 is not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

Thus, claim 112 cannot be classified as invention 1.

Claim 115 shares the technical feature of a compound including a moiety of R (corresponding to the linker not including the peptide moiety of claim 115, for example, the C=O group adjacent to the bioorthogonal functional group of the present application [FIG. 1-1]), or a salt thereof with claim 1 classified as invention 1.

However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure (for example, the -C(=O) moiety of the thioacid described in example 1) of document 1, and thus cannot be said to be a special technical feature.

In addition, there do not exist other identical or corresponding special technical features between claim 115 and claim 1.

In addition, claim 115 is not dependent on claim 1. In addition, claim 115 is not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

Thus, claim 115 cannot be classified as invention 1.

Next, the presence or absence of special technical features is examined for claims 112 and 115 after excluding the invention in the claims classified as invention 1

Claim 112 has the special technical feature of

"a soluble protein regioselectively having a bioorthogonal functional group, or a salt thereof, wherein the soluble protein comprises one or more specific amino acid residues in a target region consisting of 1-50 consecutive amino acid residues, and 5 or more specific amino acid residues in a non-target region outside of said target region, and

wherein the bioorthogonal functional group is regioselectively bound to the one or more specific amino acid residues contained in the target region with a regioselectivity of 30% or more via a linker not containing a peptide moiety",

and thus is classified as invention 2.

Claim 115 share the technical feature of
"a soluble protein regioselectively having a substance, or a salt thereof,
wherein the soluble protein comprises one or more specific amino acid residues in a target region consisting of 1-50 consecutive amino acid residues, and 5 or more specific amino acid residues in a non-target region outside of said target region, and
wherein the bioorthogonal functional group is regioselectively bound to the one or more specific amino acid residues contained in the target region with a regioselectivity of 30% or more via a linker not containing a peptide moiety"
with claim 112 classified as invention 2.

In addition, no basis can be found for stating that said common technical feature does not make a contribution over the prior art, and thus said common technical feature is a special technical feature.

Thus, claim 115 has the same technical feature as claim 112 classified as invention 2, and thus is classified as invention 2.

Accordingly, this application can be said to include the following 2 inventions: the invention in claims 1-111, 113, 114, 116, and 117; and the invention in claims 112 and 115.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１７３４５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K19/00(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K19/00, C07K16/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	WO 2015/191883 A1 (DOPHEN BIOMEDICAL) 2015.12.17, 特許請求の範囲、Fig.4、5、18、[0127]-[0133]、Example 6、8 & EP 3154574 A1 & JP 2017-519045 A, 特許請求の範囲、図４、５、１８、[0112]-[0118]、実施例６、８	112, 115 1-111, 113, 114, 116, 117
A	WO 2016/186206 A1 (国立大学法人鹿児島大学) 2016.11.24, 特許請求の範囲 & EP 3299383 A1	1-117

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２６．０７．２０１８	０７．０８．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３１２６
松田　芳子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２０１５年１月）

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
ＰＡ	TSUCHIKAMA K, et al., Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries, Protein Cell, 2018.01, vol.9, no.1, p.33-46	1-117
ＰＡ	WO 2017/191817 A1 (味の素株式会社) 2017.11.09, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-117
ＰＡ	WO 2017/217347 A1 (国立大学法人鹿児島大学) 2017.12.21, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-117
ＰＡ	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, 2月号, No.755, p.22-24	1-117

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１７３４５

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

１．☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☑ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

（第１ページ第Ⅲ欄より続く）

請求項１は、「Ａ－Ｌ－Ｂ－Ｒで表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカー、生体直交性官能基を含む、または含まない２価の基、および前記可溶性タンパク質に対する反応性基を有する化合物またはその塩」という特別な技術的特徴を有しているので、発明１に区分される。
また、請求項２－１１１、１１３、１１４、１１６、１１７は、請求項１の従属請求項であるか、または、発明１に区分されたいずれの請求項に対して実質同一又はそれに準ずる関係にあるので、発明１に区分することができる。

請求項１１２は、発明１に区分された請求項１と、生体直交性官能基とＲの一部（請求項１１２のペプチド部分を含まないリンカーに相当、例えば、本願[図 1-1]の生体直交性官能基に隣接するＣ＝Ｏ基）を有する化合物またはその塩という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴は、文献１（特表２０１２－５１２８４５号公報）の開示内容（例えば、実施例１に記載のチオ酸の－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ2－ＣＨ2－ＣＨ2Ｃ（＝Ｏ）－ＳＨの部分（ＳＨ基は生体直交性官能基に相当））に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。
また、請求項１１２と請求項１との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
さらに、請求項１１２は請求項１のいずれの従属請求項でもない。また、請求項１１２は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項１１２は発明１に区分できない。

請求項１１５は、発明１に区分された請求項１と、Ｒの一部（請求項１１５のペプチド部分を含まないリンカーに相当、例えば、本願[図 1-1]の生体直交性官能基に隣接するＣ＝Ｏ基）を有する化合物またはその塩という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴は、文献１の開示内容（例えば、実施例１に記載のチオ酸の－Ｃ（＝Ｏ）の部分）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。
また、請求項１１５と請求項１との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
さらに、請求項１１５は請求項１のいずれの従属請求項でもない。また、請求項１１５は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項１１５は発明１に区分できない。

次いで、発明１に区分した請求項に係る発明を除いた後の請求項１１２、１１５を対象として、特別な技術的特徴の有無を検討する。

請求項１１２は、
「生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、
可溶性タンパク質が、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、かつ
生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。」
という特別な技術的特徴を有しているので、発明２に区分する。

請求項１１５は、発明２に区分された請求項１１２と、
「物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、
可溶性タンパク質が、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、かつ
物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、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、物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。」
という共通の技術的特徴を有している。
そして、当該共通の技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないとする根拠を見いだせないから、特別な技術的特徴である。
したがって、請求項１１５は、発明２に区分された請求項１１２と同一の特別な技術的特徴を有するものであるから発明２に区分する。

よって、この出願は、（１）請求項１－１１１、１１３、１１４、１１６、１１７に係る発明、（２）請求項１１２および１１５に係る発明の、２個の発明を包含しているといえる。