

明 細 書

発明の名称： 1 価 C C A P 生成物の製造方法

関連出願の相互参照

[0001] 本国際出願は、2019年10月24日に日本国特許庁に出願された日本国特許出願第2019-193830号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願第2019-193830号の全内容を本国際出願に参照により援用する。

技術分野

[0002] 本発明は、Fcの特定の領域を部位特異的に修飾する方法に関する。

背景技術

[0003] 本発明者らは、IgGを部位特異的に修飾する方法として、これまでIgGのFc領域に特異的に結合するペプチド(IgBP)試薬(特許文献1及び非特許文献1)やプロテインA由来のZ33ペプチド試薬を用いた方法(CCAP法)(特許文献2)を開発してきた。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開WO2016/186206号

特許文献2：国際公開WO2018/230257号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Kishimoto, S. ら. Bioconj. Chem. 30, 698-702 (2019).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] CCAP法はFc領域の特定の部位にペプチドを結合させるという部位特異性をもたらすことから、抗体の抗原結合領域と抗原との結合を阻害しないという優位性を有する。本発明者らは、開発したCCAP法を用いてFc領

域に特異的にペプチドを結合させることにより製造したFc修飾抗体を医薬及び診断薬として応用すべく開発を進めた。その結果、CCAP法によりFcの特定の部位が修飾された抗体は、非修飾抗体と比較して血中半減期が短くなるという問題を生じることを見出した。この原因について検討を重ねた結果、Fc領域は対称性を持ち、通常2つのIgG親和性ペプチド（IgBP）結合サイトがあるところ、2か所の両方の結合サイトにIgBPが結合すると血中半減期が減少する一方、このような2か所の結合サイトのうち、1か所のみにIgBPを結合させた場合には、このような血中半減期の問題が解消することを見出した。よって、本発明は、Fc領域の2か所の結合サイトのうち、1か所のみが選択的に修飾された抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、この問題を解決すべく数多くの実験条件について検討を重ねたが、CCAP法の反応条件の改良のみでは、2か所の結合サイトのうち1か所のみを選択的に修飾することは困難であった。そこで、Fc領域に結合する担体を利用した精製及び製造を試みた。具体的には、本発明者らは、Fc領域に結合することが知られているプロテインA結合カラムを用いて、CCAP法で製造したIgBP結合Fc分子から、1か所のみにIgBPが結合したFc分子（片方が未修飾のFc分子）（1価Fc分子）の精製を試みた。しかし、Fc領域へのIgBP結合価に応じた分離を効率よく行うことはできなかった。次いで、本発明者らは、IgBP固相化カラムを作成しCCAP法で製造したIgBP結合Fc分子を吸着させることにより、1価Fc分子の精製を試みた。この結果、1価Fc分子は効率よくカラムに吸着され、2か所にIgBPが結合したFc分子（2価Fc分子）はカラムに結合できず溶出された。これにより、本発明者らは1価Fc分子のみを効率よく取得できる方法を見出した。更に、片方のFcのみがIgBP結合カラムと結合している状態を作った上で、CCAP用ペプチド試薬をカラムに添加して、カラム内でCCAP法が行えるかを試みた。その結果、本方法により

，担体との結合に関与していない結合サイトのみをペプチド修飾することが可能であることを見出した。これらの結果から，本発明者らは，Fcの2か所の結合サイトのうち，1か所のみが選択的に修飾されたFc分子を効率よく提供することに成功し，本発明を完成させた。

発明の効果

[0008] 本発明の方法は，Fcの2か所の結合サイトのうち，1か所のみが選択的に修飾されたFc分子を高含有量で提供することができることから，血中半減期の長いFc分子を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]抗AVM（アベルメクチン）抗体（ヒトIgG4）にCCAP試薬Azide-PEG4-EEGPDCAYH（succinimidyl glutaryl Lys）GELVWCTFH-NH₂（Azide-EEIgBP）を反応させて得られた溶液の一部（抗体3μg）を，陰イオン交換カラムShodex QA825（Shodex）にインジェクトして，0-1MまでのNaClのグラジエント溶出を行った結果を示すグラフである。グラフの上段は未反応の抗AVM抗体の結果を示し，下段はAzide-EEIgBPと反応させた抗AVM抗体の結果を示す。下段の各矢印は溶出された未修飾抗体，1価抗体，2価抗体のピークを示す。縦軸は280nmにおける吸光度，横軸は溶出時間を表す。

[図2]コントロール抗体（AVM），ペプチド一価付加抗体（AVM-pep1），ペプチド二価付加抗体（AVM-pep2）をICRマウスに5mg/kgでi.v.投与（各群3匹）して，1時間後，4時間後，24時間後，48時間後，72時間後，168時間後の血清中抗体濃度を解析した結果を示す。縦軸は抗体濃度（μg/mL），横軸は投与後の経過時間（時間）である。AVM投与個体は四角マーカ，AVM-pep1投与個体は丸マーカ，AVM-pep2投与個体は三角マーカで示す。

[図3]IgBP固定化カラムに，ヒトIgG1をインジェクト後，pH3.5（上段），pH3.0（中段），及びpH2.5（下段）で1回目の溶出を

行い、pH 2.5で2回目の酸性溶出を行った際のクロマトグラムを示す。縦軸は280nmにおける吸光度、横軸は経過時間を表す。グラフ最下部に当該経過時間においてカラムに対して行った操作を示す。

[図4]図3において「溶出1回目」の経過時間部分の拡大クロマトグラムを示す。グラフは上から順に、1回目の溶出がpH 3.5、pH 3.0、及びpH 2.5の結果を示す。

[図5]Z33固定化カラムに、ヒトIgG1抗体をインジェクト後、pH 2.5とpH 3.5で溶出を行った際のクロマトグラムを示す。グラフの灰色線はpH 2.5の結果を示し、黒線はpH 3.5の結果を示す。縦軸は280nmにおける吸光度、横軸は経過時間を表す。

[図6]IgBPカラムにより分画されたIgGとCCAP試薬（IgBP-PEG7-N3-DBCO-MTZ-SG）の反応物の疎水クロマトグラフィによる解析結果を表すグラフである。（A）IgG（20μM）とCCAP試薬（60μM）の30分後の反応物。（B）反応物のIgBPカラムからの素通り画分。（C）IgBPカラムへの吸着画分（酸性溶出画分）。縦軸は280nmにおける吸光度、横軸は経過時間を表す。

[図7]Z33カラムにより分画されたIgGとCCAP試薬（Z33-R7C-MaI-PEG4MTZ-SG）の反応物の疎水クロマトグラフィによる解析結果を表すグラフである。（A）IgG（20μM）とCCAP試薬（60μM）の30分後の反応物。（B）反応物のZ33カラムからの素通り画分。（C）Z33カラムへの吸着画分。縦軸は280nmにおける吸光度、横軸は経過時間を表す。

[図8]IgBPカラムを用いた溶出pHの制御による、TrastuzumabとCCAP試薬の反応物から1価抗体の精製を示すグラフである。縦軸は280nmにおける吸光度、横軸は経過時間を表す。（A）第1段階目の溶出pHによる溶出パターンの違いを表す。上から下の順で、第1段階目の溶出pHを4.0、3.9、3.8、3.7、及び3.6とした結果を示す。（B）pH 3.8による第1段階溶出での素通り画分（上段）、第1段階目

溶出 (pH 3.8) (中段), 第2段階目溶出 (pH 3.5) (下段) 分画中の0価 (未修飾), 1価, 2価抗体の含有を, 陽イオン交換クロマトグラフィで分析した結果を示すグラフである。

[図9]高速液体クロマトグラフ (NGC, BioRad) に接続したIgBPカラム上での自動化CCAP反応の結果を表すグラフである。(A) 自動化CCAP反応による抗体の修飾の自動化プロセスのフローを示す。(B) 自動化CCAP反応において, CCAP試薬の濃度の違いによるカラム溶出分画の陽イオン交換クロマトグラフィによる解析結果を表すグラフである。上から下に向けて順に, CCAP試薬10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 及び40 μ Mを使用した結果を示す。縦軸は280 nmにおける吸光度, 横軸は経過時間を表す。グラフ中の数値は, 得られた抗体のIgBPの結合価数とその割合を示す。

[図10] (A) Fc分子として抗体を用いた場合の本発明のIgBP結合Fc分子を担体上で製造する方法の模式図である。まず, 担体結合用IgBPの結合した担体にFc分子を接触させて, 担体結合IgBPを介して担体とFc分子を結合させる。そこに, Fc分子結合用IgBPを接触させてIgBPが結合していない方のFc鎖に結合させる。最後に, 担体結合用IgBPとFc分子との結合を切断して, 1分子に1個の抗体結合用IgBPが結合したFc分子を回収する。(B) 上段の(A)において, CCAP試薬を用いてIgBP結合Fc分子を製造する方法の模式図である。(A)の工程に対して, 更にFc分子結合用IgBPをFc分子に結合させた後, 架橋剤をFc分子と共有結合させる工程が追加で含まれる。(C) 抗体結合用IgBPと架橋剤が開裂可能なリンカーを介して連結している試薬を用いた1価の官能基結合Fc分子の製造方法の模式図である。Fc分子結合用IgBPをFc分子に結合させた後, 架橋剤とFc分子を共有結合させる。架橋剤と抗体結合用IgBPが開裂可能なリンカーを介して連結しているため, リンカー一部分で切断して, Fc分子結合用IgBPをFc分子から解離させることにより, IgBPを含むことなくFc分子に1価の官能基を導入することが

できる。

[図11] (D) 1価の官能基又は機能性分子が結合したFc分子の製造方法の模式図である。図10の方法(C)において、リンカー部分で切断後に官能基を含む化合物や機能性分子をFc分子に結合させる工程をさらに含む。なお、本模式図では、「F」で表される官能基又は機能性分子をFc分子に結合させてから担体から回収しているが、担体から回収後に官能基又は機能性分子をFc分子に結合させてもよい。(E) Fc分子結合用IgBPと、開裂可能なリンカーを介して官能基を含む基又は機能性分子が結合し、当該官能基を含む基又は機能性分子が更に架橋剤と結合している試薬を用いた、1価の官能基又は機能性分子が結合したFc分子の製造方法の模式図である。

(C)と同様に、架橋剤をFc分子と共有結合させた後、リンカーの開裂及び抗体結合用IgBPの解離を行うことにより、IgBPが結合していない1価の官能基結合Fc分子又は機能性分子結合Fc分子を得ることができる。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、Fc分子を構成する2本のFc鎖のうち1本のFcの結合サイトに担体上のIgBP（担体結合用IgBP）を結合させることにより、Fc鎖に導入しようとするIgBP（Fc分子結合用IgBP）が2個結合した抗体と1個又は0個結合した抗体とを効率よく分離可能であることを見出したこと、及び、担体結合用IgBPと結合したFc鎖へFc分子結合用IgBPを結合させることにより、1分子のIgBPのみをFc分子に結合可能であることを見出したことに基づく。すなわち、本発明は、担体結合用IgBPが結合した担体を利用することによる、1分子のIgBPのみが結合したFc分子の製造方法を提供するものである。

[0011] 本明細書において、「IgGのFc領域」及び「Fc領域」とは同義であり、典型的には、IgGのタンパク分解酵素パパイイン処理物として得られるC末端側の断片を意味する。Fc領域は一般的には2本の対称Fc鎖からなるが、Fc領域を形成する2本のFc鎖は厳密に同一である必要はない。Fc

c鎖とは、IgGのタンパク分解酵素パepsin処理物として得られるC末端側の断片を形成するダイマーの単量体を意味する。本明細書のIgGのFc領域は、野生型のIgGのFc領域の全長である必要はなく、用いられるIgGのFc領域に特異的に結合するIgG親和性ペプチドへの結合力を保持しているかぎり、その短縮形や変異体又は他の物質との融合物であってもよい。本明細書に記載の方法は、架橋剤結合IgG親和性ペプチドとIgGのFc領域とを親和性を利用して結合させた後、架橋剤によりIgG親和性ペプチドとIgGのFc領域との共有結合を形成すること（CCAP法）を含んでいてもよい。よって、用いられるIgGのFc領域に特異的に結合するIgG親和性ペプチドへの結合力とは、IgG親和性ペプチドとIgGのFc領域とが親和性により結合する能力、及び、IgG親和性ペプチドとIgGのFc領域とが共有結合される能力の両方を意味する。例えば、本明細書におけるIgGのFc領域は、野生型IgGのFc領域中の用いられるIgG親和性ペプチドが結合する位置を除くアミノ酸の一部（1～10個、1～5個、1～3個）のアミノ酸であって、前記親和性に影響しない部位であり、かつ、必要に応じて共有結合に関与するアミノ酸（通常はLys）以外の部位のアミノ酸が置換され、付加又は挿入され、あるいは、欠失していてもよい。

[0012] 本明細書において、「IgGのFc領域を有する分子」及び「Fc分子」とは同義であり、IgGのFc領域を含む、ペプチド、タンパク質、又はその他の複合体を意味し、野生型又は人工のIgGやその変異体の他、Fc融合タンパク質に代表されるIgGのFc領域と他の物質（活性成分、薬剤、タンパク質、低分子化合物、中分子化合物、高分子化合物、マトリックス、脂質、リポソーム、ナノ粒子、DDS用ビークル、核酸及び／又はペプチド）との融合体、及びFc領域のみからなる分子をも含む。例えば、Fc分子がFc融合タンパク質である場合、Fcと融合させるタンパク質又はペプチドとしては、受容体、サイトカイン、インターロイキン、血液凝固第ⅤⅡⅠ因子、CTLA4、ヒトラクトフェリン、TNF受容体、若しくはLFA

ー 3, あるいはその一部（好ましくは標的結合部分）などが挙げられる。本明細書において、「Fc 分子組成物」とは、複数の Fc 分子を含有する組成物を意味する。

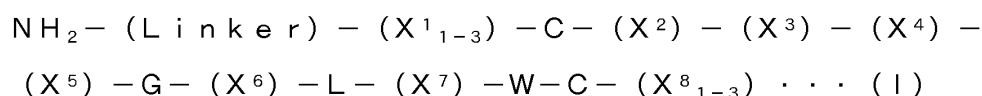
[0013] 本明細書中において「IgG」は、哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット、マウス、及びウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物の IgG であってよく、好ましくはヒトの IgG (IgG1, IgG2, IgG3 又は IgG4) である。本明細書における IgG として好ましくは、ヒト IgG1, IgG2, 若しくは IgG4, 又はウサギ IgG であり、特に好ましくはヒト IgG1, IgG2, 又は IgG4 である。

[0014] 本明細書において、「IgG の Fc 領域に特異的に結合する IgG 親和性ペプチド」及び「IgBP」とは同義であり、IgG の Fc 領域に特異的に結合するペプチドを意味する。IgBP として、好ましくは、Fc における E u n u m b e r i n g に従う L y s 2 4 8, L y s 2 4 6, L y s 3 3 8, L y s 2 8 8, L y s 2 9 0, L y s 3 6 0, L y s 4 1 4, 及び L y s 4 3 9 から選択される部位及び／又はその近接領域、好ましくは L y s 2 4 8 及び／又はその近接領域に結合するか、あるいは、プロテイン A の結合領域に結合するペプチドである。例えば、IgBP は、Fc 結合能を有するプロテイン A の部分ペプチド又はその変異体であってもよい。このようなペプチドの具体的な例が国際特許公開公報 WO 2 0 0 8 / 0 5 4 0 3 0, WO 2 0 1 3 / 0 2 7 7 9 6, WO 2 0 1 6 / 1 8 6 2 0 6, WO 2 0 1 8 / 2 3 0 2 5 7 号, 及び K y o h e i M u g u r u m a ら, A C S O m e g a (2 0 1 9) ; 4 (1 1) : 1 4 3 9 0 - 1 4 3 9 7. に記載されており、それらはそれぞれの文献に記載の方法に従って適宜調製することができる。

[0015] 本明細書に記載の方法は、IgBP（担体結合用 IgBP）を結合させた担体を利用して、前記 IgBP と同一又は異なる IgBP（Fc 分子結合用 IgBP）を Fc 分子が有する 2 か所の結合サイトのうち 1 か所にのみに効

率的に結合させるものである。以下、本明細書において、担体に結合させる I g B P を「担体結合用 I g B P」という。また、F c 分子に結合させることを目的とする I g B P を「F c 分子結合用 I g B P」という。また、担体結合用 I g B P が結合した担体を「I g B P 結合担体」といい、F c 分子結合用 I g B P が結合した F c 分子を「I g B P 結合 F c 分子」という。

[0016] 担体結合用 I g B P として、具体的には、I g G の F c 領域に特異的に結合する、以下の (i) 又は (i i) のペプチドを挙げることができる。なお、本明細書において、 X^m (m は整数) はアミノ酸を表す。「 X^m_n 」は、 n 個のアミノ酸 X^m が結合していることを表し、 n が記載されていない「 X^m 」はアミノ酸 X^m が 1 個存在することを表す。ここで、 n が 2 以上の場合、複数の X^m はそれぞれ独立して同一又は異なるアミノ酸であってよい。また、 n が「 $p \sim q$ 」である場合、アミノ酸 X^m が $p \sim q$ 個存在することを表す。(i) 下記式 (I) で表されるペプチド：



[式 (I) において、(L i n k e r) はリンカーを表し、1～3 個の X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、及び 1～3 個の X^8 は、それぞれ互いに独立して、同一又は異なるアミノ酸残基を示し、

各 X^1 、 X^2 、 X^3 及び各 X^8 は、互いに独立して、同一又は異なる、C 以外の任意のアミノ酸残基を示し、

X^4 は、H、R、S、又は T であり、

X^5 は K、C、D、E、R、V、F、L、2-アミノスベリン酸、D p r、O r n、A c O r n、A c D a b、D a b、N l e、N v a、T l e、A l a (t - B u)、及び C h a から選択される 1 個のアミノ酸残基であり、

X^6 は、E、N、R、又は D であり、

X^7 は、I 又は V である。

[0017] 式 (I) において、L i n k e r は、(G S G G S)₁₋₃、(S G S G S)₁₋₃、(G G G G S)₁₋₃、若しくは (P E G)₂₋₁₀ (好ましくは、(P E G

)₄)であるか、又は存在しない。また、担体との結合のため、式(1)のC末端のカルボキシル末端(−COOH)に、アミノ基が結合して(−C(=O)NH₂)基となっていてよく、任意で該カルボキシル末端とアミノ基との間にLinker(上述と同じく定義される)が挿入されていてもよい。C末端にLinkerが存在する場合、N末端側のLinkerは存在しなくてもよい。すなわち、(X¹₁₋₃)−C−(X²)−(X³)−(X⁴)−(X⁵)−G−(X⁶)−L−(X⁷)−W−C−(X⁸₁₋₃)−(Linker)−NH₂となっていてよい。また、式(1)において、N末端のアミノ基はアセチル化されていてもよい(この場合、N末端側のLinker中のN末端近傍の適切な位置にLys残基が導入される)。

[0018] 前記式(1)で表されるペプチドとして、好ましくは、以下のペプチドが挙げられる。[1] X¹₁₋₃が、(S, G, F, 又はなし)−(D, G, A, S, P, Hcy, 又はなし)−(S, D, T, N, E, 又はR)で表されるアミノ酸配列である。

[2] X¹₁₋₃が、D, GPD, R, GPR, SPD, GDD, GPS, SD, D, RGN, G−Hcy−D, RGP, 又はGPDである。

[3] X¹₁₋₃が、D又はGPDである。

[4] X²が、A, S, 又はTである。

[5] X²が、A又はTである。

[6] X²が、Aである。

[7] X³が、Y又はWである。

[8] X³が、Yである。

[9] X⁴が、Hである。

[10] X⁵が、A, R, K, C, D, E, L, 2−アミノスベリン酸, Dpr, R, F, 2−アミノスベリン酸, Dpr, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Ala(t-Bu), 及びChaから選択される1個のアミノ酸残基である。

[11] X⁵が、K, R, AcOrn, である。

[12] X^5 が、V, Dab, F, R, L, Nva, Nle, Ala (t-Bu), 及びChaから選択される1個のアミノ酸残基である。

[13] X^5 が、F, R, L, Nva, Nle, Ala (t-Bu), 及びChaから選択される1個のアミノ酸残基である。

[14] X^5 が、L, Ala (t-Bu), 及びChaから選択される1個のアミノ酸残基である。

[15] X^6 が、E又はNである。

[16] X^6 が、Eである。

[17] X^7 が、Vである。

[18] $X^{8_{1-3}}$ が、(S, T, 又はD) - (H, G, Y, T, N, D, F, Hcy, 又はなし) - (Y, F, H, M, 又はなし) である。

[19] $X^{8_{1-3}}$ が、T, TFH, S, SFH, THH, TFY, TYH, 又はT-Hcy-Hである。

[20] $X^{8_{1-3}}$ が、T又はTFHである。

[0019] 前記式(1)で表されるペプチドとしては、以上の条件の任意の1つ又は2以上の組み合わせであってもよく、例えば、以下に記載された条件を満たすペプチドであってもよい：[8]と[9]；[8]と[17]；[9]と[17]；[8]と[9]と[17]；あるいはこれらと[10]～[14]のいずれか1つとの組み合わせである。

より具体的には、以下のペプチドを挙げることができる（以下において X^5 は上述と同じであり；N末端に NH_2 - (Linker) -基を有していてもよく、C末端に $-\text{NH}_2$ 基又は NH_2 - (Linker) -基を有していてもよい）：

- 1) DCAYHX⁵GELVWCT (配列番号1)
- 2) GPDCA YHX⁵GELVWCTFH (配列番号2)
- 3) RCAYHX⁵GELVWCS (配列番号3)
- 4) GPRCA YHX⁵GELVWCSFH (配列番号4)
- 5) SPDCAYHX⁵GELVWCTFH (配列番号5)

- 6) GDDCAYHX⁵GELVWCTFH (配列番号6)
- 7) GPSCAYHX⁵GELVWCTFH (配列番号7)
- 8) GPDCAYHX⁵GELVWCSFH (配列番号8)
- 9) GPDCAYHX⁵GELVWCTHH (配列番号9)
- 10) GPDCAYHX⁵GELVWCTFY (配列番号10)
- 11) SPDCAYHX⁵GELVWCTFY (配列番号11)
- 12) SDDCAYHX⁵GELVWCTFY (配列番号12)
- 13) RGNCA YHX⁵GQLVWCTYH (配列番号13)
- 14) G-Hcy-DCAYHX⁵GELVWCT-Hcy-H (配列番号14)
- 15) RRGPDCA YHX⁵GELVWCTFH (配列番号15)
- 16) DCTYHX⁵GNLVWCT (配列番号16)
- 17) DCAYHX⁵GNLVWCT (配列番号17)
- 18) DCTYHX⁵GELVWCT (配列番号18)
- 19) DCAWHX⁵GELVWCT (配列番号19)
- 20) DCTYTX⁵GNLVWCT (配列番号20),
- 21) DCAYTX⁵GNLVWCT (配列番号21),
- 22) DCSYTX⁵GNLVWCT (配列番号22),
- 23) DCTWTX⁵GNLVWCT (配列番号23),
- 24) DCTYHX⁵GNLVWCT (配列番号24),
- 25) DCTYRX⁵GNLVWCT (配列番号25),
- 26) DCTYSX⁵GNLVWCT (配列番号26),
- 27) DCTYTX⁵GNLVWCT (配列番号27),
- 28) DCTYTX⁵GELVWCT (配列番号28),
- 29) DCTYTX⁵GRLVWCT (配列番号29),
- 30) DCTYTX⁵GDLVWCT (配列番号30),
- 31) DCTYTX⁵GNLIWCT (配列番号31),
- 32) DCAYHRGELVWCT (配列番号32)

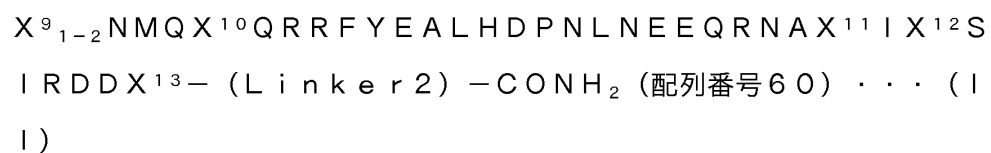
- 33) GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号33)
- 34) RCAYHRGELVWCS (配列番号34)
- 35) GPRCAYHRGELVWCSFH (配列番号35)
- 36) SPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号36)
- 37) GDDCAYHRGELVWCTFH (配列番号37)
- 38) GPSCAYHRGELVWCTFH (配列番号38)
- 39) GPDCAYHRGELVWCSFH (配列番号39)
- 40) GPDCAYHRGELVWCTHH (配列番号40)
- 41) GPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号41)
- 42) SPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号42)
- 43) SDDCAYHRGELVWCTFY (配列番号43)
- 44) DCTYHRGNLVWCT (配列番号44)
- 45) DCAYHRGNLVWCT (配列番号45)
- 46) DCTYHRGELVWCT (配列番号46)
- 47) DCAWHRGELVWCT (配列番号47)
- 48) DCTYTNGNLVWCT (配列番号48)
- 49) DCAYTNGNLVWCT (配列番号49)
- 50) DCSYTNGNLVWCT (配列番号50)
- 51) DCTWTNGNLVWCT (配列番号51)
- 52) DCTYHNGNLVWCT (配列番号52)
- 53) DCTYRNGNLVWCT (配列番号53)
- 54) DCTYSNGNLVWCT (配列番号54)
- 55) DCTYTRGNLVWCT (配列番号55)
- 56) DCTYTNGELVWCT (配列番号56)
- 57) DCTYTNGRLVWCT (配列番号57)
- 58) DCTYTNGDLVWCT (配列番号58)
- 59) DCTYTNGNLIWCT (配列番号59)

一例として、以下の構造を有するペプチドを担体結合用IgBPとして用

いることができる。



(ii) 下記式 (I I) で表されるペプチド、又は (I I) のアミノ酸配列において、 $X^9 \sim X^{13}$ 以外の位置で 1 若しくは数個のアミノ酸が付加、欠失、及び／又は置換されたアミノ酸配列を含むペプチド：



[式 (I I) において、(Linker 2) はリンカーを表し、

X^9_{1-2} は、GF, AF, VF, LF, IF, MF, PF, FF, WF, KF, Orn-F, CF, DF, EF, betaアラニン-F, 2-アミノスベリン酸-F, Dpr-F, $\text{NH}_2-(\text{PEG})_n-\text{CO}$ (ここで、 $n=1-50$)-F, F, K, Orn, C, D, E, 2-アミノスベリン酸, Dpr, 及びAcetyl-Kからなる群から選択され、

X^{10} は、C又はQであり、

X^{11} 及び X^{12} は、それぞれ独立に、R, H, D, E, S, T, N, Q, Y, 及びCからなる群から選択され、

X^{13} は、C又はPであるか、存在しない]。

[0020] 式 (I I) において、Linker 2 は、(GSGGS)₁₋₃, (SGSGS)₁₋₃, (GGGGS)₁₋₃, 若しくは (PEG)₂₋₁₀-Lys (好ましくは、(PEG)₄-Lys) であるか、又は存在しない。また、式 (I I) の N 末端アミノ酸の末端 ($-\text{NH}_2$) はアセチル化されて ($\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$) 基となってもよい。また、Linker 2 はアミノ末端に結合していてもよく (この場合、N 末端側の Linker 中の N 末端近傍の適切な位置に Lys 残基が導入される)、この場合、C 末端の Linker 2

は存在しても存在しなくてもよい。

[0021] 前記式 (11) で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとして、好ましくは、以下のペプチドが挙げられる。

[21] X^9 が、GF, AF, β AlaF, $\text{NH}_2-(\text{PEG})_n-\text{CO}$ ($n=2\sim10$)-F, F, K, Orn, C, 及びDprからなる群から選択される。

[22] X^9 が、GF, F, 及びKからなる群から選択される。

[23] X^{10} が、Qである。

[24] X^{11} 及び X^{12} が、それぞれ独立して、R, H, 及びEからなる群から選択される。

[25] X^{11} 及び X^{12} がRである。

[0022] 前記式 (11) で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとして、より具体的には、以下のペプチドを挙げることができる：

60) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIDDC (配列番号62),

61) GFNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIDDC (配列番号63),

62) KNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIDDC (配列番号64),

63) GFNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIDDC (配列番号65),

64) KNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIDDC (配列番号66),

65) FNMQQQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIDD (配列番号67), 又は

66) GKNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIDDC (配列番号68)。

[0023] 例えば、以下の構造を有するペプチドを担体結合用IgBPとして用いる

ことができる。

Acetyl-FNMQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARI
RSIRDDP-SGSGSK-NH₂

Acetyl-FNMQCRRRFYEALHDPNLNEEQRNARI
RSIRDDC-SGSGSK-NH₂

Acetyl-FNMQQRRRFYEALHDPNLNEEQRNARI
RSIRDDP-(PEG)₄-Lys-NH₂

Acetyl-FNMQCRRRFYEALHDPNLNEEQRNARI
RSIRDDC-(PEG)₄-Lys-NH₂

担体結合用IgBPは、担体との共有結合のため、少なくとも一つのアミノ基(-NH₂)を有する。このようなアミノ基は、好ましくはN末端のアミノ基であるが、担体との結合が可能である限り、N末端又はC末端近部の（例えば、リンカー中に位置する）リシン残基、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、Dpr、アルギニン残基の側鎖アミノ基であってもよい。

[0024] Fc分子結合用IgBPとして、具体的には、IgGのFc領域に特異的に結合する、以下の(iii)又は(iv)のペプチドを挙げることができる。

(iii) 下記式(I')で表されるペプチド：

$$Z - [(\text{Linker } 3) - (X^{1-3}) - C - (X^2) - (X^3) - (X^4) - (X^5) - G - (X^6) - L - (X^7) - W - C - (X^{8-3})] \cdots (I')$$

[式(I')において、Zは官能基を表し、[(Linker 3) - (X¹⁻³) - C - (X²) - (X³) - (X⁴) - (X⁵) - G - (X⁶) - L - (X⁷) - W - C - (X⁸⁻³)]であらわされる構造の任意の部分に結合し、(Linker 3)はリンカーを表し、1～3個のX¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, 及び1～3個のX⁸は、それぞれ互いに独立して、同一又は異なるアミノ酸残基を示し、

各 X^1 , X^2 , X^3 及び各 X^8 は、互いに独立して、同一又は異なる、C以外の任意のアミノ酸残基を示し、

X^4 は、H, R, S, 又はTであり、

X^5 はK, C, D, E, R, V, F, L, 2-アミノスベリン酸, Dpr, Orn, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Tie, Ala(t-Bu), 及びChaから選択される1個のアミノ酸残基であり、

X^6 は、E, N, R, 又はDであり、

X^7 は、I 又はVである。]

前記式(1')で表されるペプチドは、N末端に官能基を有する代わりに、C末端に官能基を有していてもよい。すなわち、前記式(1')で表されるペプチドは、以下の式(1'')で表されるペプチドであってもよい。

$$[(X^{1-3})-C-(X^2)-(X^3)-(X^4)-(X^5)-G-(X^6)-L-(X^7)-W-C-(X^{8-3})-(\text{Linker } 3)]-Z \cdots (1'')$$

[式(1'')において、Zは官能基を表し、 $[(X^{1-3})-C-(X^2)-(X^3)-(X^4)-(X^5)-G-(X^6)-L-(X^7)-W-C-(X^{8-3})-(\text{Linker } 3)]$ であらわされる構造の任意の部分に結合し、(Linker 3)はリンカーを表し、1~3個の X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 , 及び1~3個の X^8 は、それぞれ互いに独立して、同一又は異なるアミノ酸残基を示し、

各 X^1 , X^2 , X^3 及び各 X^8 は、互いに独立して、同一又は異なる、C以外の任意のアミノ酸残基を示し、

X^4 は、H, R, S, 又はTであり、

X^5 はK, C, D, E, R, V, F, L, 2-アミノスベリン酸, Dpr, Orn, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Tie, Ala(t-Bu), 及びChaから選択される1個のアミノ酸残基であり、

X^6 は、E, N, R, 又はDであり、

X^7 は、I 又はVである。]

式(1')及び式(1'')において、Linker3は、RRRGS、EEGGS若しくは(PEG)₁₋₈(好ましくは、(PEG)₄)であるか、又は存在しない。また、式(1')のC末端アミノ酸の末端(-COOH)にアミノ基が結合して(-C(=O)NH₂)基となってもよい。また、式(1'')のN末端アミノ酸の末端(-NH₂)にアセチル基が結合して(CH₃-C(=O)-NH-)基となってもよい。

[0025] 前記式(1')及び式(1'')で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとしては、Z-(Linker3)-(X¹₁₋₃)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸₁₋₃)又は(X¹₁₋₃)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸₁₋₃)-(Linker3)-Zであってもよい。好ましいアミノ酸配列は、上記式(1)で表されるペプチドにおいて好ましいアミノ酸配列と同様である。

[0026] 一例として、Fc分子結合用IgBPとしては、以下のペプチドを挙げることができる。

Acetyl-K(Z)-RRRGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

Acetyl-K(Z)-EEGGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

Acetyl-K(Z)-(PEG)₄-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂マレイミド-RRRGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

マレイミド-EEGGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

マレイミド-(PEG)₄-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

DBCO-RRRGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

DBCO-EEGGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

DBCO-(PEG)₄-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

テトラジン-RRRGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂

テトラジン-EEGGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂
 テトラジン-(PEG)₄-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂
 TCO-RRRGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂
 TCO-EEGGS-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂
 TCO-(PEG)₄-GPDCA YHKGEL VWCTFH-NH₂
 Acetyl-K(Z)RRRGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 Acetyl-K(Z)EEGGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 Acetyl-K(Z)-(PEG)₄-DCAYHKGEL VWCT-NH₂

2

マレイミド-RRRGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 マレイミド-EEGGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 マレイミド-(PEG)₄-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 DBCO-RRRGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 DBCO-EEGGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 DBCO-(PEG)₄-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 テトラジン-RRRGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 テトラジン-EEGGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 テトラジン-(PEG)₄-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 TCO-RRRGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 TCO-EEGGS-DCAYHKGEL VWCT-NH₂
 TCO-(PEG)₄-DCAYHKGEL VWCT-NH₂

(iv) 下記式 (I I') で表されるアミノ酸配列を含むペプチド, 又は (I I') のアミノ酸配列において, X⁹~X¹⁴以外の位置で1若しくは数個のアミノ酸が付加, 欠失, 及び/又は置換されたアミノ酸配列を含むペプチド

:

X⁹₁₋₂NMQX¹⁰QX¹⁴RFYEALHDPNLNEEQRNAX¹¹I X¹²SIRDDX¹³-(Linker 2)-NH₂ (配列番号61) ... (I I')

[式 (I I') において, (L i n k e r 2) はリンカーを表し,

X^9_{1-2} は, G F, A F, V F, L F, I F, M F, P F, F F, W F, K F, O r n - F, C F, D F, E F, b e t a アラニン - F, 2 - アミノスベリン酸 - F, D p r - F, $NH_2 - (P E G)_n - CO$ (ここで, $n = 1 - 50$) - F, F, K, O r n, C, D, E, 2 - アミノスベリン酸, D p r, 及び A c e t y l - K からなる群から選択され,

X^{10} は, C 又は Q であり,

X^{11} 及び X^{12} は, それぞれ独立に, R, H, D, E, S, T, N, Q, Y, C, 及び K (Z) からなる群から選択され,

X^{13} は, C 又は P であるか, または存在せず,

X^{14} は, R, C, K, 又は K (Z) であり,

Z は官能基である]。

[0027] 式 (I I') において, L i n k e r 2 は, S G S G S K, S R R C R, S R R K (Z) R, S R R C R R C R R C, S R R K (Z) R R K (Z) R R K (Z), 若しくは $(P E G)_{1-8} - L y s$ (好ましくは, $(P E G)_4 - L y s$) であるか, 又は存在しない。また, 式 (I I') の N 末端アミノ酸の末端 ($-NH^2$) はアセチル化されて $(CH_3 - C(=O) - NH -)$ 基となっていてよい。また, リンカーに含まれる C y s 残基 (C) は, 必要に応じて, マレイミド基を介して他の機能性分子が結合していてもよい。

[0028] 前記式 (I I') で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとして, 好ましくは, 以下のペプチドが挙げられる。

[a] X^9 が, G F, A F, $\beta A l a F$, $NH_2 - (P E G)_n - CO$ ($n = 1 \sim 50$) - F, F, K, O r n, C, D p r, 及び A c e t y l - K からなる群から選択される。[b] X^9 が, G F, F, 及び A c e t y l - K からなる群から選択される。

[c] X^{10} が, Q である。

[d] X^{11} 及び X^{12} が, それぞれ独立して, R, H, 及び E からなる群から選択される。

[e] X^{11} が、Rである。

[f] X^{12} が、R又はK (Z) である（好ましくは、Zがアジドである）。

[0029] 前記式 (I I') で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとして、より具体的には、上述の60) ~ 66) に記載のペプチドを挙げることができる（ただし、含まれるリシン残基は必要に応じて官能基が結合していてもよい）。また、具体的には、Fc分子結合用IgBPとして、以下のペプチドを挙げることができる：

FNMQQQCRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDD-NH₂

FNMQQQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDC-NH₂

FNMQQQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDP-SRRK (Z) R-NH₂

FNMQQQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDP-SRRCR-NH₂

FNMQQQCRFY EALHDPNLN EEQRNARIC SIRDDP-SRRCRRCRRC-NH₂

FNMQQQK (Z) RFY EALHDPNLN EEQRNARIK (Z) SIRDDP-SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) -NH₂

Acetyl-KNMQQQCRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDD-NH₂

Acetyl-KNMQQQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDC-NH₂

Acetyl-KNMQQQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDP-SRRK (Z) R-NH₂

Acetyl-KNMQQQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDP-SRRCR-NH₂

Acetyl-KNMQQQCRFY EALHDPNLN EEQRNARIR

CSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH₂
Acetyl-KNMQQQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRN
ARIK (Z) SIRDDP-SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) -
NH₂
GFNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD
-NH₂
GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD
C-NH₂
GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD
P-SRRK (Z) R-NH₂
GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD
P-SRRCR-NH₂
GFNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIC SIRDD
P-SRRCRRCRRC-NH₂
GFNMQQQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARIK (Z)
) SIRDDP-SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) -NH₂
FNMQCQZRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC
-NH₂
Acetyl-KNMQCQZRFYEALHDPNLNEEQRNARI
RSIRDDC-NH₂
GFNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI
RDDC-SRRK (Z) R-NH₂
FNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI
DDC-NH₂
Acetyl-KNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRN
ARIRSIRDDC-SRRK (Z) R-NH₂
GFNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI
RDDC-SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) -NH₂

Acetyl-KNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRN
 ARIRSI RDDC-SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) -NH₂
 GFNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI
 RDDC-SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) -NH₂

好ましくは、Fc分子結合用IgBPは、Fc分子と結合させることを意図する他の機能性分子を結合させるための「官能基(Z)」がリシン残基、N末端のアミノ基、またはリンカーに結合しているか、又は他の基やリンカーを介して他の部分、例えば、C末端に結合している。本明細書における「官能基」とは、穏やかな条件下で、ペプチド、タンパク質、核酸、又は低分子医薬と反応して結合することができる基を意味する。官能基としては、マレイミド、チオールもしくは保護チオール、アルコール、アクリラート、アクリルアミド、アミンもしくは保護アミン、カルボン酸もしくは保護カルボン酸、アジド、シクロアルキンを含むアルキン、シクロペンタジエン及びフランを含む1,3-ジエン、アルファ-ハロカルボニル、N-ヒドロキシスクシンイミジル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル、ニトロフェニルエステル、カルボナート、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)、テトラジン、メチルテトラジン(MTZ)、トランスシクロオクテン(TCO)が挙げられる。

[0030] 例えば、本明細書のFc分子結合用IgBPは、N末端又はC末端（好ましくは、N末端）に、必要に応じてリンカーを介して、官能基としてアジド基が結合していてもよい。

好ましくは、IgBPのN末端及び／又はC末端に更にグルタミン酸が1～3個（好ましくは、2個）結合したペプチドの末端にアジド基を有する。アジド基を有するIgBPは、Dibenzylcyclooctyne(DBCO)、アルキン、TCOを有する他の機能性分子とクリック反応することによって、当該他の機能性分子をIgBPに連結することができる。また、Fc分子結合用IgBPと他の機能性物質の結合は、その他の当業者に公知の方法、例えばマレイミド基とスルフヒドリル基の反応等により行うこと

もできる。

[0031] 本明細書のFc分子結合用IgBPは、他の機能性分子が結合していてもよい。例えば、このような他の分子は、前記官能基を介して（例えば、アミノ末端などに）結合させることもできるし、Fc分子結合用IgBP中のアミノ酸（例えば、リシン残基）が官能基を有する場合には、当該官能基（例えば、リシン残基が置換基として有するアジド基）に結合させることもできるし、あるいは、Fc分子結合用IgBP中のCys残基（好ましくは、Linker、例えば、Linker2又はLinker3中のCys残基）にマレイミド基を介して結合させることもできる。

[0032] Fc分子結合用IgBPに結合させることができる他の機能性分子としては、ペプチド、タンパク質、核酸、又は低分子医薬を含む、標識物質又は医療用薬剤が含まれるが、これに限られない。Fc分子の抗原特異性やその他の特性を適用可能なあらゆる分子を他の分子として結合させることができる。このような物質としては、抗癌剤、低分子医薬品、放射性標識、蛍光標識、核酸医薬、遺伝子治療薬、ペプチド医薬、IgA又はVHH等の抗体などが挙げられる。

[0033] 標識物質により標識されている場合、Fc分子結合用IgBPがFc分子と複合体を形成することで、該標識物質を介してFc分子の検出又は定量を行うことが可能となる。標識物質は、限定されないが、例えば蛍光色素、化学発光色素、放射性同位元素（例えば、放射性ヨウ素又は放射性同位体金属イオンのキレート錯体、例えばDOTA又はデスフェリオキサミンのキレート錯体）、並びにビオチン及びGFP（緑色蛍光タンパク質）等の蛍光タンパク質、発光タンパク質、並びにペルオキシダーゼ等の酵素を含み、好ましい標識物質の例は、フルオレセイン及びFITC等のフルオレセイン誘導体、ローダミン及びテトラメチルローダミン等のローダミン誘導体、並びにテキサスレッド等の蛍光色素である。

[0034] Fc分子結合用IgBPを他の薬剤によって修飾する場合、薬剤として、限定するものではないが、例えば、オーリスタチンE等のオーリスタチン、

メイタンシン、エムタンシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、又はこれらの誘導体等の抗がん剤；並びに、血液脳関門上のレセプターに結合して中枢神経への移行を可能とする薬剤、又はがん細胞等に結合して抗体の細胞内への移行を可能にする薬剤等の標的化剤が挙げられる。薬剤を連結している場合、Fc分子結合用IgBPは、例えば医薬抗体として用いられるIgGと複合体を形成することで、疾患の治療効果を高めることができる。

[0035] Fc分子結合用IgBPは、抗体との共有結合のため、少なくとも一つのアミノ基（ $-NH_2$ ）を有する。このようなアミノ基は、アミノ末端のアミノ基であってもよいし、リシン残基、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、ジアミノプロピオン酸、アルギニン残基の側鎖アミノ基であってもよい。

[0036] このようなFc分子結合用IgBPにおける、リシン残基、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、ジアミノプロピオン酸、アルギニン残基（好ましくは、リシン残基）又は1位のアミノ酸のアミノ基は、任意で抗体と共有結合するための架橋剤で修飾されていてもよい。本明細書において、このように架橋剤で修飾されたIgBPを「CCAP試薬」ということがある。Fc分子結合用IgBPとして、好ましくはCCAP試薬である。本明細書において「架橋剤」とは、IgBPと、Fc分子とを、共有結合により連結させるための化学物質である。架橋剤は、当業者であれば適宜選択することが可能であり、所望のアミノ酸（例えば、リシン残基、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、ジアミノプロピオン酸、アルギニン残基等）と結合可能な部位を少なくとも2箇所有する化合物とすることができる。このような架橋剤としては、DSG（ジスクシンイミジルグルタレート）、DSS（ジスクシンイミジルスベレート）、DMA（アジプイミド酸ジメチル二塩酸塩）、DMP（ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩）、DMS（スベルイミド酸ジメチル二塩酸塩）、DTBP（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（ジチオビス（スクシンイミジルブ

ロピオン酸)) を挙げることができる、好ましくはDSG, DSS, 又はDSPである。例えば、DSS又はDSG等のスクシンイミジル基を含む架橋剤は、リシン残基の側鎖及びポリペプチドのN末端に存在する一級アミンと反応するため、IgBPのN末端をブロックした上でDSS又はDSGと反応させることにより、IgBPのリシン残基の側鎖のみをDSS又はDSGで特異的に修飾することができる。このようなアミノ酸残基と架橋剤の組み合わせは、当業者であれば適宜選択することができる。架橋剤で修飾されているIgBPとIgGとの間の架橋は、例えば、IgBPの上記X⁵, X⁹, X¹¹, X¹², X¹⁴のアミノ酸残基とIgGのFc領域のLys248又はLys246, 好ましくはLys248の間で部位特異的に生じさせることができる。

[0037] 好ましくは、前記式(1), (1'), (1''), (11), 及び(11')で表されるペプチドにおいて、C末端に最も近いシステイン及びN末端に最も近いシステインの2個のシステイン残基同士は、ジスルフィド結合又はリンカーを介して連結されることにより環状ペプチドを形成していてもよい。このようなリンカーとして利用可能な2価の基としては、例えば、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$ 基, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 基, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{N}-\text{R})-\text{CH}_2-$ 基, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ 基, $-\text{C}(=\text{O})-$ 基, 及び $-\text{C}(=\text{N}-\text{R})-$ 基を挙げることができる(ここで、Rは、置換されていてもよいアルキル基、例えば、置換されていてもよいC1~C6アルキル、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、又はヘキシル基)であり、ここで置換されている場合の置換基としては、例えば、ヒドロキシ基、(モノ若しくはポリ)エチレンオキシド基、カルボキシル基、アルコキシ基、アシル基、アルキル基、アミド基、エステル基、ハロゲン基(F, Cl, Br, 又はI), 又はこれらの組み合わせであってよい)。当該リンカーは、通常のジスルフィド結合よりも、安定性、例えばアルカリ耐性又は還元反応等耐性、好ましくはアルカリ耐性に優れる。また、このように結合される2つのシステイン残基としては、式(1), (1'), (1'')における、X¹と

X^2 の間に位置するシステイン残基とWと X^8 との間のシステイン残基、及び、式(11)、及び(11')における X^{10} と X^{13} が共にシステイン残基である場合には、これらのシステイン残基を挙げることができる。

[0038] 本明細書において、K(Z)は、官能基結合リシン残基を意味する、好ましくは、K(Z)はK(Azide)である。

[0039] また、本明細書のIgBPは、N末端のアミノ酸のアミノ基がアセチル化されていてもよい。また、本明細書のIgBPは、C末端のアミノ酸のカルボキシル基がアミド化され(アミノ基が結合して)いてもよい。また、更に、本明細書のIgBPは、必要に応じて、その末端、又は前記アジド基とペプチド部分の間がPEGで修飾されていてもよい。PEG修飾されている場合のPEGの重合度は、2～10、3～8、4～7とすることができる。

[0040] Fc分子は、含有するIgGのFc領域において、2本で対となる対称な重鎖定常領域の部分ペプチド鎖(Fc鎖)を有するため、Fc分子結合用IgBPが結合する部位が2か所存在する。このため、Fc分子結合用IgBPは、Fc分子1分子に0～2個結合することができる。Fc分子1分子に1個のIgBPが結合したFc分子とは、上述のFc分子中の2本の対称な重鎖定常領域由来部分ペプチドのうち、片方にのみIgBPが結合したFc分子を意味する。本明細書において、Fc分子1分子にFc分子結合用IgBP結合していないことを「0価」、Fc分子1分子に1個のFc分子結合用IgBPが結合していることを「1価」、Fc分子1分子に2個のFc分子結合用IgBPが結合していることを「2価」という。なお、本明細書において、Fc分子1分子の語は、IgG1分子を構成可能なペアとなった2本のFc領域を含む分子を意味する。

[0041] 本明細書に記載されたアミノ酸配列において、Aはアラニン残基であり、Rはアルギニン残基であり、Nはアスパラギン残基であり、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、Qはグルタミン残基であり、Eはグルタミン酸残基であり、Gはグリシン残基であり、Hはヒスチジン残基であり、Iはイソロイシン残基であり、Lはロイシン残基であり、Kはリ

シン残基であり、Mはメチオニン残基であり、Fはフェニルアラニン残基であり、Pはプロリン残基であり、Sはセリン残基であり、Tはトレオニン残基であり、Wはトリプトファン残基であり、Yはチロシン残基であり、Vはバリン残基である。また、Hcyはホモシステインであり、Dprはジアミノプロピオン酸であり、Ornはオルニチン残基であり、 β Alaは β アラニン残基であり、Dabは2, 4-ジアミノ酪酸残基であり、Nleはノルロイシン残基であり、Nvaはノルバリン残基であり、Tleはtert-ロイシン残基であり、Ala(t-Bu)はtert-ブチルアラニン残基であり、かつ、Chaはシクロヘキシルアラニン残基である。また、側鎖にアミノ基を有する残基（リシン残基、オルニチン残基、2, 4-ジアミノ酪酸残基）中のアミノ基は、必要に応じてアセチル化されていてもよい。本明細書において天然及び人工アミノ酸のアセチル化形態は、上述のアミノ酸標記にAcの接頭語を伴って記載されることもあるが、特にそのように解することが不整合である場合を除き、Acと記載されていなくてもアセチル化形態を含みうると解される。K(Azide)はアジド結合リシン残基を表す。

（精製による方法）

一態様において、本発明は、（Fc分子結合）IgBPと反応させたFc分子組成物における、1価の割合を高める方法であって、

Fc分子結合用IgBPと（結合）反応させたFc分子と、前記Fc分子結合用IgBPと同一又は異なる担体結合用IgBPが結合した担体とを接触させて、前記Fc分子結合用IgBPを結合させたFc分子を担体に結合させること、

該担体に結合しなかった前記Fc分子を除去すること、及び

該担体に結合した前記Fc分子を回収することを含む方法に関する。

[0042] 前記精製方法において用いる、「Fc分子結合用IgBPと反応させたFc分子組成物」は、国際特許公開公報WO2008/054030、WO2013/027796、WO2016/186206、及びWO2018/

230257に記載の方法に準じてFc分子結合用IgBPとFc分子とを混合することにより得ることができる。なお、前記方法において、最初のステップの前に、Fc分子結合用IgBPとFc分子を反応させて、Fc分子結合用IgBPと反応させたFc分子組成物を得ることを含んでもよい。好ましくは、「Fc分子結合用IgBPと反応させたFc分子」は、上述の架橋剤を介してFc分子結合用IgBPと共有結合させたFc分子を意味する。Fc分子結合用IgBPが架橋剤で修飾されている場合、該混合工程の条件は、Fc分子結合用IgBPとFc分子との間で架橋反応が生じる条件で行うものであれば特に限定されないが、例えば、Fc分子結合用IgBPとFc分子とを、適当なバッファー中において、室温（例えば約15℃～30℃）で混合することにより反応させることができる。該混合工程は、必要に応じて架橋反応を促進する触媒を適量加えて行ってもよい。該混合工程におけるFc分子結合用IgBPとFc分子との混合比率は、特に限定されるものではないが、例としてIgBP：Fc分子のモル比率は、1：1～20：1、好ましくは2：1～20：1又は5：1～10：1とすることができる。該混合工程における混合時間（反応時間）は、Fc分子結合用IgBPとFc分子との間で架橋反応が生じる限り限定するものではないが、例えば、1分～5時間、好ましくは10分～2時間又は15分～1時間とすることができる。Fc分子結合用IgBPと反応させたFc分子組成物は、更に、必要に応じて、精製されていてもよい。精製は、本分野で公知の方法、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィ、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、及びHPLC等のクロマトグラフィ等により行うことができる。

[0043] 本発明は、「担体結合用IgBPが結合した担体」を含む。担体結合用IgBPが結合した担体は、例えば、アミノ基と反応性の官能基を有する担体に、担体結合用IgBPを反応させて製造することができる。担体の形状としては、ゲル（例えば、カラム用ゲル）、粒子、ビーズ、ナノ粒子、微粒子、マクロビーズ、膜、マイクロプレート、及びアレイなどの形状が挙げられ

、その材質としては、磁性物質、ラテックス、アガロース、ガラス、セルロース、セファロース、ニトロセルロース、ポリスチレン、その他の高分子材料が挙げられる。好ましくは、該担体はカラム用ゲルである。担体としては、例えば、HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare) などを用いることができる。反応は、両者が十分に結合する条件で行われ、例えば、緩衝液中、室温で1～5時間（好ましくは、2.5～3.5時間）接触させることにより行うことができる。

[0044] Fc分子結合用IgBPと反応させたFc分子と、担体結合用IgBPが結合した担体との接触は、両者が十分な接触可能な条件で行われる。例えば、担体のカラムの場合、Fc分子結合用IgBPと反応させたFc分子を担体結合用IgBP固定化カラムにインジェクトすることにより行われる。

[0045] 担体に結合しなかった前記Fc分子を除去することは、常法により行うことができ、例えば、緩衝液（pH約7.0）にてFc分子を結合させた担体を洗浄することにより行うことができる。

[0046] 担体に結合したFc分子の回収は、pH2.5以上で行うことができるが、Fc分子の変性を防ぐため酸性度が弱いことが望ましく、好ましくはpH3.6以上であり、更に、1価の修飾Fc分子を高割合で溶出させるためには、pH3.7以上、pH3.8以上が好ましく、pH3.8、pH3.9、pH4.0、pH4.1、pH4.2、pH4.3又はそれらの任意の2点の間の値とすることができ、例えば、pH3.6～pH4.3、pH3.6～pH4.2、pH3.6～pH4.1、pH3.6～pH4.0、pH3.7～pH4.2、pH3.7～pH4.1、pH3.7～pH4.0、pH3.8～pH4.0又はpH3.8～pH3.9とすることができる。

[0047] 回収されたFc分子組成物における、1価のFc分子の、全Fc分子（100%）に対する割合としては、55%以上、63%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上又は98%以上とすることができる。

（担体上でIgBPを結合させる方法）

別の態様において、本発明は、Fc分子結合用IgBP及び担体結合用I

g B Pを用いて、1価のF c分子を調製する方法であって、

F c分子を、担体結合用I g B Pが結合した担体と反応させてF c分子結合担体を得ること、

得られたF c分子結合担体中のF c分子とF c分子結合用I g B Pとを担体上で反応させて、(F c分子結合用I g B P) - (F c分子) - (担体結合用I g B P) - (担体)の結合物を得ること、及び

該担体からF c分子結合用I g B PとF c分子の結合物を回収することを含み、

ここで、前記F c分子結合用I g B Pと担体結合用I g B Pは同一又は異なっているいてもよい、方法に関する。

[0048] 本方法は、F c分子結合用I g B PとしてCCAP試薬を使用することにより、抗体とF c分子結合用I g B Pとを架橋剤により共有結合させる工程を含んでいてもよい。更に、本方法は、F c分子結合用I g B Pと他の機能性分子とを結合する工程を含んでいてもよい。これらの工程は、担体からF c分子結合用I g B PとF c分子の結合物を回収する前に担体上で行ってもよいし、担体から回収されたF c分子結合用I g B PとF c分子の結合物について行ってもよい。

[0049] 担体結合用I g B Pが結合した担体は、上述の精製方法に記載された方法に準じて製造することができる。

[0050] F c分子と、担体結合用I g B Pが結合した担体との反応は、上述の精製方法に記載されたF c分子結合用I g B Pと反応させたF c分子と、担体結合用I g B Pが結合した担体との接触方法に準じて行うことができる。

[0051] 担体結合F c分子とF c分子結合用I g B Pとの反応は、両者を接触させることにより行うことができる。反応温度は、4℃～室温とすることができる、反応pHは、4.5～6.0とすることができる。反応時間は、3時間以上が好ましく、より好ましくは、6時間以上、12時間以上である。担体がカラムである場合、用いるF c分子結合用I g B Pの濃度としては、10～60 μM、又は20～40 μMとすることができる。I g B P好ましくは、

F c 分子結合用 I g B P は架橋剤と結合しており、F c 分子と F c 分子結合用 I g B P との反応は架橋反応を含む。

[0052] 担体からの F c 分子結合用 I g B P と F c 分子の結合物の回収は、上述の精製方法に記載された担体に結合した F c 分子の回収と同様に行うことができる。

[0053] 回収された F c 分子組成物における、1 価の F c 分子の、全 F c 分子（100%）に対する割合としては、53%以上、55%以上、56%以上、59%以上、80%以上、85%以上、86%以上又は89%以上とすることができる。

[0054] 1 価の F c 分子を調製する方法に使用した全 F c 分子（100%）に対する、得られた 1 価の F c 分子の割合としては、39%以上（又は、40%以上、50%以上、55%以上、又は74%以上）とすることができる。

[0055] 担体がカラムである場合、本法は高速液体クロマトグラフを用いて、自動化することができる。自動化する場合には、10～60 μ M の F c 分子結合用 I g B P 溶液を 0.03～1 mL/分、又は 0.05～1 mL/分で 10 分間流して行うことができる。

（官能基結合 F c 分子を調製する方法）

一態様において、本発明は、1 価の官能基や 1 個の他の機能性分子が導入された F c 分子の製造方法も包含する。このような官能基や他の機能性分子は、I g B P 上の官能基、C y s 残基、L y s 残基、又はアミノ基などの結合性の基を介して導入することもできるし、I g B P と F c 分子を結合させた後に F c 分子の C y s 残基や L y s 残基などの結合性の基と官能基を有する化合物や機能性分子とを共有結合させることにより導入することもできる。手順としては、上述の方法により F c 分子に 1 価の F c 分子結合用 I g B P を結合させた後、必要な官能基や他の機能性分子を結合させてもよいし、あるいは、そのような官能基や他の機能性分子を結合させた F c 分子結合用 I g B P を用いて上述の方法を実施することにより、官能基や他の機能性分子が導入された F c 分子結合用 I g B P を F c 分子に結合させてもよい。

[0056] また、Fc分子結合用IgBPを用いてFc分子に官能基又は他の機能性分子を共有結合させて導入した後、Fc分子結合用IgBPを除去可能であることが知られている（Kei Yamadaら，（2019）Angew. Chem. ; 131 : 5648－5653）。すなわち、Fc分子結合用IgBPをFc分子に結合した後、Fc分子のCys残基やLys残基などの結合性の基と官能基を有する化合物や機能性分子とを共有結合させ、Fc分子結合用IgBPをFc分子から解離させてから、Fc分子結合用IgBPがFc分子から切断除去されていてもよい。また、この工程は、担体上で担体結合用IgBPとFc分子の結合物に対して行われてもよい。よって、本発明の、1価の官能基や1個の他の機能性分子が導入されたFc分子は、Fc分子結合用IgBPを含んでいなくてもよい。

[0057] すなわち、本発明は、Fc分子1分子中に存在する2本のFc鎖のうち1本にのみ官能基が結合したFc分子であってIgBPが結合していないFc分子（官能基結合Fc分子）を多く含むFc分子組成物を調製する方法であって、（i）Fc分子を、担体結合用IgG親和性ペプチド（担体結合用IgBP）が結合した担体と反応させてFc分子結合担体を得ること；（ii）得られたFc分子結合担体中のFc分子に、開裂可能なリンカー（Cleavable Linker）を介して架橋剤が結合したFc分子結合用IgG親和性ペプチド（開裂可能（Cleavable）架橋剤（Crosslinking agent）結合IgBP：CCB-IgBP）を反応させて、CCB-IgBPとFc分子との結合物を得ること；（iii）前記架橋剤と前記Fc分子とを反応させて共有結合させること；（iv）前記リンカーを開裂させて、架橋剤とFc分子結合用IgBPとの間の結合を切断すること；（v）Fc分子結合用IgBPをFc分子から解離させて、担体結合用IgBPを介して担体に結合した官能基結合Fc分子と、遊離のFc分子結合用IgBPを得ること；及び、（vi）前記担体から官能基結合Fc分子を回収することを含み；ここで、前記Fc分子結合用IgBPと担体結合用IgBPは同一又は異なってもよく；ここで、前記開裂可能なリ

ンカーと架橋剤との間に官能基を含む基が存在していてもよく；ここで、官能基結合Fc分子中に含まれる官能基は、前記開裂可能なリンカーと架橋剤との間に存在する官能基（図11（E）参照）であるか、又はリンカーが開裂することにより生じた基（図10（C）参照）である、方法に関する。

（機能性分子結合Fc分子を調製する方法）

本発明は、Fc分子1分子中に存在する2本のFc鎖のうち1本にのみ機能性分子が結合したFc分子であってIgBPが結合していないFc分子（機能性分子結合Fc分子）を多く含むFc分子組成物を調製する方法であって、（i）Fc分子を、担体結合用IgG親和性ペプチド（担体結合用IgBP）が結合した担体と反応させてFc分子結合担体を得ること；（ii）得られたFc分子結合担体中のFc分子に、開裂可能なリンカー（Cleavable Linker）を介して架橋剤が結合したFc分子結合用IgG親和性ペプチド（開裂可能（Cleavable）架橋剤（Crosslinking agent）結合IgBP：CCB-IgBP）を反応させて、CCB-IgBPとFc分子との結合物を得ること；（iii）前記架橋剤と前記Fc分子とを反応させて共有結合させること；（iv）前記リンカーを開裂させて、架橋剤とFc分子結合用IgBPとの間の結合を切断すること；（v）Fc分子結合用IgBPをFc分子から解離させて、担体結合用IgBPを介して担体に結合した官能基結合Fc分子と、遊離のFc分子結合用IgBPを得ること；（vi）官能基結合Fc分子の官能基に機能性分子を結合させて機能性分子結合Fc分子を得ること；及び、（vii）前記担体から機能性分子結合Fc分子を回収することを含み；ここで、前記Fc分子結合用IgBPと担体結合用IgBPは同一又は異なってもよく；ここで、前記開裂可能なリンカーと架橋剤との間に官能基を含む基が存在していてもよく；ここで、官能基結合Fc分子中に含まれる官能基は、前記開裂可能なリンカーと架橋剤との間に存在する官能基（図11（E）参照）であるか、又はリンカーが開裂することにより生じた基（図10（C）参照）である、方法に関する。なお、本方法において、（vi）の機能性分子

の結合する工程と (v i i) の担体から F c 分子を回収する工程はどちらを先に行ってもよい。

[0058] また、本発明は、F c 分子 1 分子中に存在する 2 本の F c 鎖のうち 1 本にのみ機能性分子が結合した機能性分子結合 F c 分子であって I g B P が結合していない F c 分子を多く含む F c 分子組成物を調製する方法であって、(i) F c 分子を、担体結合用 I g G 親和性ペプチド (担体結合用 I g B P) が結合した担体と反応させて F c 分子結合担体を得ること；(i i) 得られた F c 分子結合担体中の F c 分子に、開裂可能なリンカー (C l e a v a b l e L i n k e r) を介して架橋剤が結合した F c 分子結合用 I g G 親和性ペプチド (開裂可能 (C l e a v a b l e) 架橋剤 (C r o s s l i n k i n g a g e n t) 結合 I g B P : C C B - I g B P) を反応させて、C C B - I g B P と F c 分子との結合物を得ること；(i i i) 前記架橋剤と前記 F c 分子とを反応させて共有結合させること；(i v) 前記リンカーを開裂させて、架橋剤と F c 分子結合用 I g B P との間の結合を切断すること；(v) F c 分子結合用 I g B P を F c 分子から解離させて、担体結合用 I g B P を介して担体に結合した機能性分子結合 F c 分子と、遊離の F c 分子結合用 I g B P を得ること；及び、(v i) 前記担体から機能性分子結合 F c 分子を回収することを含み；ここで、前記 F c 分子結合用 I g B P と担体結合用 I g B P は同一又は異なってもよく；ここで、前記開裂可能なリンカーと架橋剤との間に機能性分子が結合している、方法に関する (図 1 1 (E) 参照)。

[0059] 「官能基結合 F c 分子」とは、I g B P が結合しておらず、かつ官能基が結合している F c 分子を意味する。官能基は、リンカー、架橋剤、及び／又は他の構造を介して F c 分子に結合していてもよい。「機能性分子結合 F c 分子」とは、I g B P が結合しておらず、かつ官能基が結合している F c 分子を意味する。機能性分子は、リンカー、架橋剤、及び／又は他の構造を介して F c 分子に結合していてもよい。「C C B - I g B P」は、開裂可能なリンカーの分解により、架橋剤と I g B P が切断される構造である限り、す

なわち、(架橋剤) - (開裂可能なリンカー) - (IgBP) の順で結合していれば、他の物質を含んでいてもよく、例えば、(架橋剤) - (Fc分子に導入したい物質又は構造) - (開裂可能なリンカー) - (IgBP) であってもよい。ここで、Fc分子に導入したい物質又は構造の代表例は機能性分子又は官能基を含む基である。

[0060] 本願において、「開裂可能なリンカー (Cleavable Linker)」とは、酸性条件、塩基性条件、還元、酸化、酵素処理、光照射や β 脱離により分解してFc分子結合用IgG親和性ペプチドと架橋剤との間の結合が切断される結合基を有するリンカーであり、例えば、ジスルフィド結合、アセタール結合、エステル結合、及びアミド結合を挙げることができる。また、このような開裂可能なリンカーの一例は、切断性部分としてWO2018/199337に記載されている。

(組成物)

別の態様において、本発明は、前記精製方法又は調製方法により得られたIgBP結合Fc分子を含む組成物に関する。すなわち、本発明は、IgBPが1個のみ結合したFc分子の全Fc分子に対する割合が、従来のCCAP法により合成されたIgBP結合Fc分子における同割合よりも高いことを特徴とする、Fc分子組成物に関する。ここで、従来のCCAP法とは、試験管内でIgBPとFc分子とを結合させるCCAP法であり、この語は、本発明のようなIgBP結合担体を用いた方法と区別する目的で使用される。より具体的には、従来のCCAP法とは、国際特許公開公報WO2008/054030、WO2013/027796、及びWO2016/186206に記載された方法を含む。

[0061] 好ましくは、本発明の組成物は、IgBPが1個のみ結合したFc分子の、全Fc分子を100%としたときの割合が、52%以上、53%以上、55%以上、56%以上、59%以上、63%以上、70%以上、80%以上、85%以上、86%以上、89%以上、90%以上、95%以上、又は98%以上である。

[0062] 本発明の組成物は、必要に応じて、医療用又は診断用組成物とすることができる。本発明の組成物が医療用組成物（治療用及び／又は予防用組成物）である場合、IgB Pは、例えば上記の薬剤により修飾されていることが好ましく、診断用組成物に含まれる場合、IgB Pは、例えば上記の標識物質により修飾されていることが好ましい。医療用又は診断用組成物の対象疾患は、使用するFc分子や結合薬剤を選択することにより、適宜設定することができ、例えば、抗体により標的化可能な疾患又は障害、好ましくは、がん、炎症性疾患、感染症、及び神経変性疾患が挙げられる。

[0063] 例えば、医療用又は診断用組成物は、注射剤として利用することができ、静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、IgB P結合Fc分子を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製することができる。調製された注射液は、通常、適当なアンプル、バイアル、シリンジに充填される。また、IgB P結合Fc分子に適当な賦形剤を添加することにより、凍結乾燥製剤を調製し、用時、注射用水、生理食塩水などで溶解して注射液とすることもできる。なお、一般的に抗体などのタンパク質の経口投与は消化器により分解されるため困難とされるが、抗体断片や修飾した抗体断片と剤形の創意工夫により、経口投与の可能性もある。経口投与の製剤としては、例えば、カプセル剤、錠剤、シロップ剤、顆粒剤等を挙げることができる。

[0064] 医療用又は診断用組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好適である。このような投薬単位の剤形としては、注射剤（アンプル、バイアル、プレフィルドシリンジ）が例示され、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、5～100mg、10～250mgのIgB P結合Fc分子を含有していても良い。

[0065] 医療用又は診断用組成物の投与は、局所的であってもよく、全身的であってもよい。投与方法には特に制限はなく、上述のとおり非経口的又は経口的に投与される。非経口的投与経路としては、皮下、腹腔内、血中（静脈内、

若しくは動脈内)又は脊髄液への注射又は点滴等が挙げられ、好ましくは血中への投与である。医療用又は診断用組成物は、一時的に投与してもよいし、持続的又は断続的に投与してもよい。例えば、投与は、1分間～2週間の持続投与することもできる。

[0066] 医療用又は診断用組成物の投与は、所望の治療効果又は予防効果が得られる投与量及び投与時期であれば特に限定は無く、症状、性別、年齢等により適宜決定することができる。例えば、有効成分の1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、上記疾患の臨床症状が生ずる前及び／又は後に、1月1～10回程度、好ましくは1月1～5回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。

[0067] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。なお、本願明細書全体を通じて引用する文献は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

(材料)

プロテインAカラム、プロテインGカラム、ならびにペプチド固定化用カラムは、HiTrap Protein A HP Columns, HiTrap Protein G HP, HiTrap NHS-activated HP (1ml, GE Healthcare) カラムを用いた。

(実施例1) CCA P法による抗体コンジュゲートの血中半減期

(1) CCA P法による抗体コンジュゲートの作製

20mM 酢酸緩衝液 (pH4.5) に溶解した8μM 抗AVM (アベルメクチン) 抗体 (ヒトIgG4) 5ml に、DMSO中に溶解したCCA P試薬Azide-PEG4-EEGPDCAYH (succinimidy l glutaryl Lys) GELVWCTFH (配列番号69) -NH₂ (Azide-EEIgBP, 534μM) を154μL加え (最終濃度16μM) , 室温で1時間反応させた。この溶液の一部 (抗体3μg) を

, Nexera-i (Shimadzu) に接続した陰イオン交換カラム Shodex QA825 (Shodex) にインジェクトし, 10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 中にて, 0 から 1 M までの NaCl のグラジエント溶出を行った結果を図 1 に示す。得られた 1 価抗体ならびに 2 価抗体を分取し, PBS にて透析後, 血中半減期測定のためのサンプルに用いた。

(2) 血中半減期の測定

抗アベルメクチン (AVM) 抗体の Azide-EE IgBP ペプチド試薬による修飾 1 価抗体, 2 価抗体の血中半減期の測定を, マウスを用いて行った。コントロール抗体 (AVM), ペプチド一価付加抗体 (AVM-pep1), ペプチド二価付加抗体 (AVM-pep2) を ICR マウスに 5 mg/kg で i.v. 投与 (各群 3 匹) して, 1 時間後, 4 時間後, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後, 168 時間後の血清中抗体濃度を解析した。

(3) 結果

図 2 は, 抗体投与から 1 時間後, 4 時間後, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後, 及び 168 時間後の血清中抗体濃度を解析した結果を示す。表 1 は, この実験の血清中抗体濃度の変化から, 薬物動態パラメーターを解析したものである。表 1 に示したように, 1 価抗体の半減期 ($T_{1/2\beta} = 264$ h) は, 未修飾抗体 ($T_{1/2\beta} = 268$ h) とほぼ同等であるのに比べ, 2 価抗体は, 未修飾抗体に比べ, 半減期が約半分 ($T_{1/2\beta} = 139$ h) となるのが分かった。つまり, 1 価修飾では, 血中半減期に大きな影響を与えないが, 2 価修飾では, 修飾抗体の血中半減期が大きく減弱することが分かった。

[0068] [表1]

表1 1 価抗体 2 価抗体のマウス血中半減期のパラメーター

	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	CL (L/h/kg)	V_{dis} (L/kg)	MRT (h)
AVM	11.6 $\pm$ 2.3	284 $\pm$ 144	6490 $\pm$ 490	18000 $\pm$ 7400	0.305 $\pm$ 0.102	107 $\pm$ 14	394 $\pm$ 205
AVM 1価ペプチド	9.29 $\pm$ 3.43	264 $\pm$ 85	5350 $\pm$ 750	14200 $\pm$ 4400	0.382 $\pm$ 0.143	129 $\pm$ 18	367 $\pm$ 121
AVM 2価ペプチド	7.54 $\pm$ 0.98	139 $\pm$ 33	1720 $\pm$ 320	2500 $\pm$ 520	2.06 $\pm$ 0.42	297 $\pm$ 82	146 $\pm$ 39

CCAP法により作成したコンジュゲート抗体を医薬品として使用する場合、未修飾体と同様の血中半減期を有する1価修飾体を使用することは、薬剤の生物活性を保持するうえでも、重要である。しかし、CCAP法でコンジュゲートを作製した場合、図1にも示したように、必ず1価抗体に加え、2価抗体の生成が付随する。そこで、生成反応の段階で2価抗体の生成を抑えつつ、1価抗体の生成効率を上げるか、もしくは2価抗体を効率的に除き高純度での1価の精製手法が必要であることが明らかとなった。

(実施例2) 抗体結合カラムの作製

(1) IgB P固定化カラムの作製

N末端にGSリンカーを付加したIgG結合ペプチドIgB P (WO2013/027796) : $\text{NH}_2\text{-GSGGS-DCA YHRGEL VWCT-CONH}_2$ (MW: 1895.06) (配列番号70) をFmoc法を用いて固相合成し、脱保護後、逆相HPLCで精製した。凍結乾燥後のペプチド14mgを、50mM Tris緩衝液(pH8.6) 0.25mLに溶解し、室温で1時間放置した。LC-MS (Acquity UPLCが接続したSQ detector, Waters) によってSS結合形成を確認した後、TFAを最終1%となるように加え酸性にした。この溶液を逆相カラム (Sep-Pak C18) にアプライし、0.1% TFAで洗浄後、0.1% TFAを含む60% アセトニトリルで溶出し、有機溶媒を除いた後、凍結乾燥した。

[0069] DMSOに溶解した7.5mMペプチド溶液0.720mLを、2.88mLの0.2M NaHCO_3 (pH=8.3) で希釈したのち、5mLの1mM HClで洗浄済みのHiTrap NHS-activated HP (1mL, GE Healthcare) カラム (3本) に、1mL (ペプチド量: 1.5 μmol) ずつゆっくりと注入し、注入後は室温で3時間放置した。0.2M NaHCO_3 (pH=8.3) 5mLで洗浄した後、6mLの0.5M NaClを含む0.5M モノエタノールアミン-HCl

(pH 7.5) によるブロッキング (10 分間) と、6 mL の 0.5 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液 (pH 4.0) による洗浄を交互に 3 回繰り返した。最後に、5 mL の 20 mM リン酸バッファー (pH 7.0) でカラム内を置換し、4℃にて保管した。このようにして作製された 3 本のカラムへのペプチドの固定化量は、投与ペプチドに対する割合から、72.7% (1090.5 nmol)、77.4% (1161 nmol) 及び 73.1% (1096.5 nmol) と評価された。

(2) Z33 固定化カラムの作製

カラム固定化のためのリンカー部を C 末に導入した IgG 結合ペプチド Z33 (Braisted, A. C. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:5688-92 (1996)): Acetyl-FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI RDDP SGSGSK-NH₂) (配列番号 71) を Fmoc 法を用いて固相合成し、脱保護後、逆相 HPLC で精製した。凍結乾燥後のペプチド 23.8 mg を、330 µL の DMSO に溶解し 15 mM の溶液を調製した。このペプチド溶液 250 µL に同量の DMSO を加え、2.0 mL の 0.2 M NaHCO₃ (pH=8.3) で希釈したのち、5 mL の 1 mM HCl で洗浄済みの HiTrap NHS-activated HP (1 mL, GE Healthcare) カラム (2 本) に、1 mL (ペプチド量: 1.5 µmol) ずつロードし、室温で 3 時間放置した。0.2 M NaHCO₃ (pH=8.3) 5 mL で洗浄した後、6 mL の 0.5 M NaCl を含む 0.5 M モノエタノールアミン-HCl (pH 7.5) によるブロッキング (10 分間) と、6 mL の 0.5 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸ナトリウム-HCl 緩衝液 (pH 4.0) による洗浄を交互に 3 回繰り返した。最後に、5 mL の 20 mM リン酸バッファー pH 7.0 でカラム内を置換し、4℃にて保管した。このようにして作製された 2 本のカラムへのペプチドの固定化量は、投与ペプチドに対する割合で、60.8% (912 nmol)、40.5% (608 nmol) と評価された。

(3) IgBP固定化カラムの溶出条件並びにDBC (Dynamic binding capacity) の評価

IgBPを固定化した1mLのカラム (IgBP固定化量: 995 nmol) をNGC™クロマトグラフィーシステム (BioRad) に接続し、20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を2mL/分で5分間流すことにより平衡化した。20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 50mLに溶解したヒトIgG1抗体1mgをインジェクトし、リン酸緩衝液 (pH 7.0) で3分間洗浄後、pH 3.5, 3.0と2.5の0.1M グリシン塩酸の溶出液を用いて2.5分間、1回目の溶出を行った。さらに、pH 2.5の0.1M グリシン塩酸にて、2回目の溶出を行い、最後に20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて初期化した (図3及び図4)。

[0070] 図4に、1回目の溶出時の拡大図を示す。pH 3.5から3.0と2.5へpHを低下させるに従い、溶出時間が早くなる傾向が見られたが、溶出された抗体のピーク面積も各pH間でほとんど差がなく、またpH 2.5での2回目に溶出時においても何も溶出されなかったことから、本カラムでの抗体の溶出は、pH 3.5で十分に行えることが分かった。

[0071] 次に、同じカラムを用い、DBC (Dynamic binding capacity) の評価を行った。NGC™クロマトグラフィーシステム (BioRad) に接続したカラムに、20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を1.0mL/分で10分間流すことにより平衡化し、同緩衝液に0.98mg/mLになるように溶解したヒト血清由来IgG (SIGMA, #14506, Lot #SLBR0560V) 溶液を、1mL/分で30mL注入した。カラムからの漏出の midpoint からDBCを求めたところ、47mgであることが分かった。また、緩衝液にて、1mL/分で6分間洗浄後、0.1M グリシン塩酸 (pH 3.5) を用いて、流速2.0mL/分にて結合したIgGを溶出させ、溶出後のタンパク質のA280の吸光度から、カラムに結合した抗体量を算出したところ、42mgであった (すべてのIgG抗体量は、1mg/mL = Abs 280 : 1.38として計算)。

(4) Z33固定化カラムの溶出条件並びにDBC (Dynamic binding capacity) の評価

作製したZ33固定化カラムの抗体の溶出条件の検討を行った。Z33を固定化した1mlのカラム (IgBP固定化量: 912nmol) をNGCTMクロマトグラフィーシステム (BioRad) に接続し、20mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を1mL/minで10分間流すことにより平衡化した。20mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 10mLに溶解したヒトIgG 1抗体1mgをインジェクトし、リン酸緩衝液 (pH7.0) で6分間洗浄後、流速2mL/分で、pH2.5とpH3.5の0.1Mグリシン塩酸の溶出液を用いて溶出した (図5)。いずれのpHによる溶出の場合においても、良好な溶出挙動が見られ、本カラムからの溶出は、pH3.5で十分に行えることが分かった。

[0072] 次に、同じカラムを用い、DBC (Dynamic binding capacity) の評価を行った。NGCTMクロマトグラフィーシステム (BioRad) に接続したカラムに、20mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を1.0mL/分で10分間流すことにより平衡化し、同緩衝液に0.67mg/mlになるように溶解したヒト血清由来IgG (SIGMA, #14506, Lot #SLBR0560V) 溶液を、1mL/分で50mL注入した。カラムからの漏出の midpoint からDBCを求めたところ、26mgであることが分かった。また、緩衝液にて、2mL/分で3分間洗浄後、0.1M グリシン塩酸 (pH3.5) を用いて、流速2.0mL/分にて結合したIgGを溶出させ、溶出後のタンパク質のA280の吸光度から、カラムに結合した抗体量を算出したところ、19mgであった (すべてのIgG抗体量は、1mg/mL = Abs280 : 1.38として計算)。

(5) カラム上でのCCAP修飾体のイオン交換カラムによる解析

アフィニティカラムから洗浄分画もしくは溶出分画として回収された抗体の解析は、各溶液0.05mLを、Nexera-i (Shimadzu) に接続した陽イオン交換カラムShodex SP825 (Shodex)

にインジェクトし、10 mM 酢酸緩衝液 (pH = 5.5) 中、0 から 0.3 M までの NaCl グラジエント溶出にて行った。

(実施例 3) IgB P 固定化カラムを使った 1 価抗体の精製

(1) IgB P 固定化カラムを使った 2 価抗体の除去

10 mg (67 nmol) の Trastuzumab を 3.3 ml の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、DMSO に溶解した 70 mM の CCAP 試薬 (MTZ-DBCO-N₃-(PEG)₇-RRDCAYHK GELVWCT (配列番号 72)-NH₂) 2.9 μL (202 nmol) を加えて一晩、室温にて反応させた。一部 (約 3 μg) を取り出し、疎水クロマト用カラム TSK gel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. × 10 cm, Tosoh) を接続した Shimadzu LC2040 (Shimadzu) にインジェクトし、流速 0.5 ml/分にて、A 液 (1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 25 mM リン酸緩衝液 pH 7.0) から、B 液 (20% イソプロパノールを含む 25 mM リン酸緩衝液 pH 7.0) までの 20 分のグラジエントにて溶出した (図 6 A)。残りの反応物を、IgB P 固定化カラムにインジェクトし、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) にて溶出した。この際のカラムから素通りした分画と酸性溶液にて溶出した分画の疎水クロマトグラフィによる分析結果を図 6 B と C に示す。IgB P カラムでは、IgG と CCAP 試薬の反応物中にあった 2 価の抗体が IgB P カラムから素通りすることで除去され、未修飾体と 1 価抗体のみを精製できる (図 6 C) ことが分かった。

(9) Z33 固定化カラムを使った CCAP 法による反応物からの 2 価抗体の除去

上記 (8) と同じ方法で調製したサンプルの一部 (約 3 μg) を、疎水クロマト用カラムで分析した (図 7 A)。残りの反応物を、Z33 固定化カラムにインジェクトし、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) にて溶出した。この際のカラ

ムから素通りした分画とpH3.5溶液にて溶出した分画の疎水クロマトグラフィによる分析結果を図7BとCに示す。Z33カラムでも、IgBPCラムと同様に、IgGとCCAP試薬の反応物中の2価抗体がIgBPCラムから素通りし、カラムに吸着した抗体を酸性溶液で溶出することにより、効率よく未修飾体と1価抗体を精製できることが分かった。

(10) 溶出時のpHの制御による1価抗体の精製

上述のように、IgBPでは、2価抗体と、1価抗体と未修飾抗体の混合物の分離はできたが、1価抗体と未修飾抗体の分離は達成できていない。そこで、1価抗体と未修飾抗体の分離を、溶出時のpHを制御することで行うことを試みた。すなわち、TrastuzumabとCCAP試薬(IgBP-N₃-RRRSS-SG)をモル比、1:1で室温、2時間反応後、反応物を、0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)で平衡化したIgBPCラムにアプライし、同緩衝液で洗浄後、0.1M酢酸緩衝液(pH4.0, pH3.9, pH3.8、pH3.7)あるいは0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH3.6)で1段階目溶出した後、0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で2段階目の溶出を行った。

[0073] 図8Aに示したように、第1段階目溶出では、pH3.6-4.0のすべての条件で、溶出ピークが得られ、第2段階目溶出では、第1段階目pH3.6で溶出した場合のみ、ピークが見られなかった。図8Bには、pH3.8での第1段階目溶出時の各分画のイオン交換クロマトグラフィの結果を示すが、素通り分画には2価抗体、第1段階目溶出分画は1価抗体、第2段階目溶出分画は2価抗体がそれぞれ主要な成分として溶出されており、IgBPCラムによって、これらの成分がきれいに分離できることが分かった。表2に、各条件下での各分画中の0, 1, 2価抗体の含有量をまとめた。第1段階目溶出pH4.0-3.7の条件間では、純度に若干の違いはあるものの、いずれも95%以上の高純度での1価抗体の精製ができることが分かった。一方、pH3.6の第1段階目溶出では、0価抗体と1価抗体の溶出が同時に起こり分離できていないことが分かった。

[0074] [表2]

表2 TrastuzumabとCCAP試薬の反応物のIgG-BPカラムからの素通り、第1段階目溶出（pH4.0、3.9、3.8、3.7、3.6）、ならびに第2段階目溶出（pH3.5）分画中のイオン交換クロマトグラフィー分析による0価、1価、2価抗体の含有率（%）

1段階目 溶出pH	アブライ (%)			第1段階目溶出 (%)			第2段階目溶出 (%)		
	0価	1価	2価	0価	1価	2価	0価	1価	2価
4.0	0	0	100	1.7	98.7	0	89.1	10.9	0
3.9	0	0	100	2.2	97.7	0	94.1	5.9	0
3.8	0	0	100	3.6	96.4	0	97.2	2.8	0
3.7	0	0	100	4.6	95.4	0	98.2	1.8	0
3.6	0	0	100	36.4	63.6	0	-	-	-

（実施例4）IgBP固定化カラム，ProteinAもしくはProteinGカラム上でのCCAP反応による1価抗体の調製

前項までに，IgBPカラムを用いて，溶出時のpHを制御することで，95%以上の高純度での1価抗体の精製が可能であることが分かった。しかし，反応に伴う2価抗体の生成が溶液中では抑えることが困難なため，全体から見た1価抗体の収量としては，反応に供した抗体の最大50%強の収量でしか回収できていない。そのため，本項では，抗体を一旦，IgBPカラムもしくはProteinAもしくはProteinGに吸着させた状態で，CCAP試薬と反応させることで，2価抗体の生成を抑えながら，1価抗体を優先的に合成する手法を検討した。

[0075] 1mgのTrastuzumabを0.1M酢酸緩衝液10mL（pH5.5）で希釈し，同緩衝液で平衡化したIgBPカラムにインジェクトした。その後，20もしくは60μMに緩衝液で直前に希釈したCCAP試薬溶液を1mLカラムに流した。そのカラムを，室温もしくは4℃にて，3時間もしくは12時間インキュベートし，5mLの0.1M 酢酸緩衝液pH5

．5でカラムを洗浄後、0.1 Mグリシン塩酸緩衝液（pH 3.5）5 mLにて溶出した。各条件下での反応物から回収した素通り分画、ならびに溶出分画を、実施例2で使用した陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分析し、各分画での0, 1, 2価抗体の含有割合（%）を計算した。結果を表3に示す（洗浄液中から回収されたものは、2価抗体のみであったので、2価抗体の含有割合のみを示す）。

[0076] 表3の1-4の条件のうち、IgB Pカラム上に固定化されたIgGを、CCAP試薬濃度20 μ Mで、室温にて、12時間反応させた場合（条件2）、溶出分画に含まれる1価抗体の生成率は、全体（素通り分画+溶出分画）の74%となり、比較した条件間で、1価抗体の割合が最も高かった。この場合、2価抗体は溶出分画に含まれないものの、洗浄分画に14%の2価抗体が見られた。1価抗体の生成率を上げるため、CCAP試薬の濃度を3倍の60 μ Mとしたが（条件3）、溶出分画中の1価抗体の割合は89%（残り11%は0価抗体）と最も高くなった。なお、この場合、素通り分画中の2価抗体が56%へと増加し、全体中の1価抗体割合は39%にとどまった。一方、洗浄分画での2価抗体の割合を減らすため、反応時間を12時間から3時間へと短縮したところ、素通り分画に溶出される2価抗体の全体中の割合は目的通りに7%と少なくなったが、溶出分画での1価抗体の割合は59%（残り41%は0価抗体）と、条件2（86%）や3（89%）に比べ低下した。また、同じ目的で、反応時間12時間のままで、反応温度を室温から4℃に変更した場合（条件4）でも、素通り分画での2価抗体の割合は目的通りに2%と減少し、全体中での1価抗体の割合として55%（溶出分画中の割合も56%）が達成できることが示された。

[0077] 比較例として、IgB Pと同様な機能を持つ市販のカラムとして、プロテインAとプロテインGカラムを使用して、カラム上での同様の反応を行った結果を表3に示した。プロテインAとプロテインGの抗体への結合サイトは、IgB Pとほぼ同じ、FcのCH2とCH3間の境界領域であり、CCAP試薬による2価抗体の生成を同様な機構で抑制できると考えられる。これ

らのカラムを使った反応の特徴は、素通り分画において、I g B Pカラムで見られた2価抗体が見られないことである（条件5－9）。これは、おそらく、プロテインAやプロテインGは、I g B Pと異なり、これらのリガンドの抗体上の結合サイトが1か所ではなく（たとえばプロテインAやGは、F a b領域にも結合サイトを持っている）、そのため、C C A P反応により2価抗体がカラム中でできたとしても、カラムに結合し続けることができるためと考えられた。これを支持するように、プロテインAやGカラムからp H 3. 5での溶出分画には、0価、1価抗体のみならず、2価抗体が含まれていた（表2の条件5－9）。精製にI g B Pカラムを利用している理由は、溶出回収物から2価抗体を除去することが目的であるため、カラム上でのC C A P反応による1価抗体の調製には、プロテインAやGカラムは不適であることが分かった。

[0078] [表3]

表3 I g B PのCCAP試薬を用いたアフィニティカラム上での抗体修飾効率 括弧内の数値は溶出分画内の比率を示し、それ以外の数値は、洗浄分画と溶出分画合計中の各成分の割合を示す。

条件	1	2	3	4	5	6	7	8	9
カラム	IgG-BP	IgG-BP	IgG-BP	IgG-BP	ProteinA	ProteinA	ProteinG	ProteinG	ProteinG
CCAP試薬濃度	20μM	20μM	60μM	20μM	20μM	20μM	20μM	20μM	20μM
温度	室温	室温	室温	4℃	室温	4℃	室温	4℃	室温
反応時間	3 h	12 h	12 h	12 h	12 h	12 h	12 h	12 h	3 h
素通り分画の2価抗体 (%)	7	14	56	2	0	0	0	0	0
溶出分画の0価抗体 (%)	38 (41)	12 (14)	5 (11)	43 (44)	1 (3)	16 (16)	6 (6)	17 (17)	18 (13)
溶出分画の1価抗体 (%)	55 (59)	74 (96)	39 (89)	55 (56)	31 (31)	56 (56)	62 (62)	65 (65)	67 (67)
溶出分画の2価抗体 (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	68 (68)	46 (46)	32 (32)	18 (18)	15 (15)

（実施例5）高速液体クロマトグラフに接続したI g B Pカラム上での自動化C C A P反応

CCAP反応によるコンジュゲートの作製の再現性を上げるためには、この反応の自動化が一つの解決策である。そこで、図9Aのスキームに示したフローに従って、CCAP反応による各修飾抗体の収率を、高速液体クロマトグラフ（NGC, BioRad）に接続したIgBPカラムを用いて検討した。自動化CCAP反応は、NGC（BioRad）クロマトグラフを用い、以下のステップで行った。

- 1) Inject mAb: 1mgの抗体を0.1M酢酸緩衝液（pH5.5）20mLに溶解し、1mL／分にてS1Port1からインジェクトした（20分間）。
- 2) Wash: 0.1M 酢酸緩衝液（pH5.5）を1mL／分にて10分間流し、カラムを洗浄した（10分間）。
- 3) Reagent: 0.1M 酢酸緩衝液（pH5.5）に希釈したCCAP試薬（10, 20, 30, 40 μ M IgBP N₃RRR-SG）1mLを0.1mL／分でインジェクトした（10分間）。
- 4) Wash: 0.1M 酢酸緩衝液（pH5.5）を1mL／分にて10分間流し、カラムを洗浄した。
- 5) Elute: 0.1M グリシン塩酸緩衝液（pH3.5）を1mL／分にて10分間流し、カラムから結合物を溶出した。
- 6) Regenerate: 0.1M 酢酸緩衝液（pH5.5）を1mL／分にて12分間流し、カラムを再生した。

[0079] 溶出分画は、実施例4と同じ方法にて、含まれる成分を分析した（図9B）。10 μ Mの試薬では、1価抗体の生成がごくわずかしき検出できなかったが、20–40 μ MのCCAP試薬の添加では、溶出分画中52–59%の割合で1価抗体（残りは0価抗体）の生成が確認された。さらに、試薬濃度を60 μ Mまで上げたが、1価抗体の生成率は、57.8%と上昇しなかった。一方、これらの実験では、表1や2の実験に比べ、反応試薬と抗体のコンタクト時間が10分間と短い。そこで、CCAP試薬の注入速度を、流速0.05mL／分として、コンタクト時間を2倍に延ばしたが、1価抗体

の生成率は、53.9%とこちらも増加は見られなかった（いずれもデータは示していない）。実際にこれらの条件下では、2価抗体の生成率は回収した抗体全体の2%以下であることから、大きな収量のロスにはつながらないと考えられた。

[0080] 以上の結果から、IgB Pカラムを用いた自動化CCAP反応により、52-59%の割合で1価抗体を得られることが示された。