

明 細 書

発明の名称：

ペプチド架橋剤及び当該架橋剤で架橋された架橋ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は架橋ペプチドの製造方法等に関する。

背景技術

[0002] タンパク質医薬及びペプチド医薬は、現在最も注目されているバイオ医薬品の1つである。特に、近年、IgG抗体を中心とした抗体医薬やペプチド医薬が、医薬分野に利用されるようになり、工業的、製薬的な利用における重要性がますます高まっている。

[0003] 本発明者は、これまでに、抗体医薬品の精製用として用いられているプロテインAカラムの代替システムを構築するため、17残基からなるIgGペプチドをジスルフィド結合で環化された特定の配列を含むペプチドリガンドを固定化したカラムによりIgGを精製することができることを報告している（特許文献1）。しかし、IgGペプチドカラムは、ペプチド内に存在しているジスルフィド結合がアルカリ性に対する耐性が低いために繰り返し利用できないという課題があった。そこで、本発明者は、ペプチドやタンパク質中のジスルフィド結合がアルカリ洗浄に対し化学的に弱いという課題を解決すべく、アルカリ耐性を高める手段について検討を重ねた結果、ペプチドやタンパク質中のシステイン残基におけるチオール基間を1,3-ジクロロアセトンを用いて架橋することで、アルカリ洗浄に対する耐性を飛躍的に高めたIgG結合ペプチドを見出してきた（特許文献2）。しかし、この架橋は、アルカリ耐性は強いものの、IgGに対する親和性が低く（ $K_d = 4.9 \mu M$ ）、機能性が損なわれるという新たな課題を生じた。そこで、架橋構造を再デザインすることで、ジクロロアセトン架橋のような大きな機能性の低下を伴わずに、アルカリ耐性が保持できる架橋構造の改良を試みた結果、ジスルフィドのチオール的一方をメチル基に変え、SS結合を CH_3-S 結合

に変換することにより、親和性はまだ若干低いものの K_d 値で 340 nM となり、アルカリ耐性を持つ実用的な架橋構造に近づけることを見出した（特許文献3）。しかし、この方法は、ペプチド中のホモセリンを一旦、塩素化した後にシステインのチオール基と反応させるため、作製収率が低いという課題があった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2013/027796号

特許文献2：国際公開第2018/092867号

特許文献3：国際公開第2020/075670号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] そこで、本発明では、さらに架橋構造を再デザインすることで、大きな親和性の低下を伴わずに、アルカリ耐性が高く機能性が保持される架橋構造を高い収率で作製する方法を提供することを課題とする。

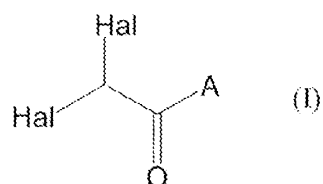
課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、さらに架橋剤の構造に関する改良を重ねた結果、通常は反応性が高く水溶液中では使用されない1,1-ジクロロアセトン及びその誘導体を架橋剤として用いることにより、アルカリ耐性並びにIgGに対して高い親和性（ $K_d = 45\text{ nM}$ ）を保持したIgG結合ペプチドの作製に成功した。この発明により、医薬品として実用化可能な収率が高く、アルカリ耐性がありながら、タンパク質やペプチドの機能を維持可能な架橋技術を提供することに成功した。

[0007] 本発明の第1の観点に係るタンパク質又はペプチド用架橋剤は、下記式（1）で表される。

[0008]

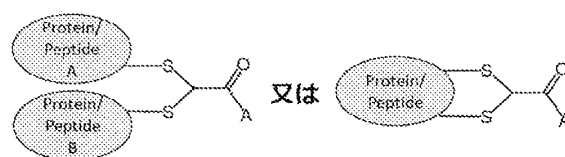
[化1]



[式中、Aは水素原子、フェニル基若しくはハロゲン原子で置換されていて
もよいC 1～6 アルキル基、又はフェニル基である]

[0009] 本発明の第2の観点に係る架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する
方法は、以下の式で表される単一の又は分離したタンパク質又はペプチドが
有する少なくとも2つのチオール基が結合された、架橋されたタンパク質又
はペプチドを製造する方法であって、

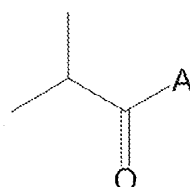
[化2]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよ
いC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、P r o t
e i n / P e p t i d e はタンパク質又はペプチドを表し、P r o t e i n
/ P e p t i d e A と P r o t e i n / P e p t i d e B とは同一又は
異なっているもよい]

前記タンパク質又はペプチドを上記本発明の第1の観点に係る架橋剤と反
応させて、前記2つのチオール基を以下の基

[化3]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基である]

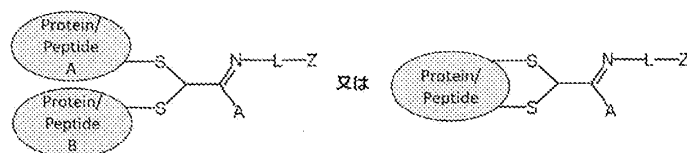
を介して互いに結合させることを含む。

[0010] 前記タンパク質又はペプチドが、前記少なくとも2つのチオール基の全部又は一部がジスルフィド結合を形成しているタンパク質又はペプチドであり、当該ジスルフィド結合を還元することにより2つのチオール基を生じさせることを含む、こととしてもよい。

[0011] 本発明の第3の観点に係るタンパク質又はペプチドのアルカリ耐性を改善する方法は、上記本発明の第2の観点に係る方法により前記タンパク質又はペプチド内のチオール基を結合させて架橋されたタンパク質又はペプチドを得ることを含む。

[0012] 本発明の第4の観点に係るタンパク質又はペプチドを製造する方法は、以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

[化4]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

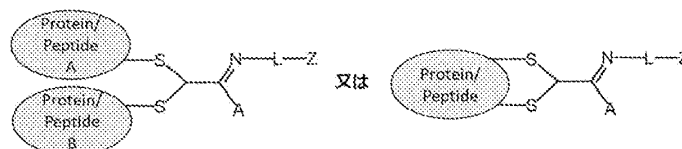
上記本発明の第2の観点に係る方法により架橋されたタンパク質又はペプチドを得ること、

得られた架橋されたタンパク質又はペプチドと $\text{NH}_2\text{--L--Z}$ (Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す)とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に反応性官能基を導入することを

含む。

[0013] 本発明の第5の観点に係るタンパク質又はペプチドを製造する方法は、以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

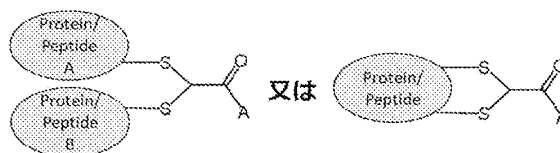
[化5]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

以下の式で表される架橋されたタンパク質又はペプチド

[化6]



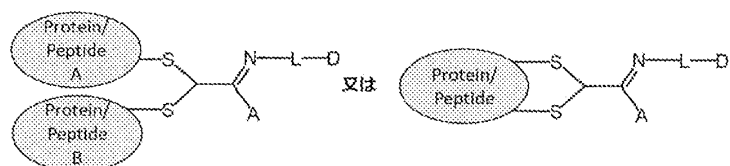
[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

と、 $\text{NH}_2\text{---L---Z}$ （Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す）とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に反応性官能基を導入することを含む。

[0014] 本発明の第6の観点に係るタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製

造する方法は、以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法であって、

[化7]



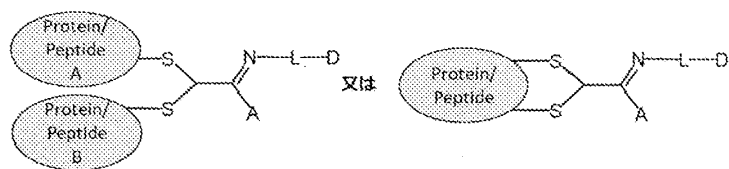
[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

本発明の第4又は第5の観点に係る方法により反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを得ること、

得られた反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドと、当該反応性官能基と反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に前記薬剤を結合させることを含む。

[0015] 本発明の第7の観点に係るタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法は、以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法であって、

[化8]

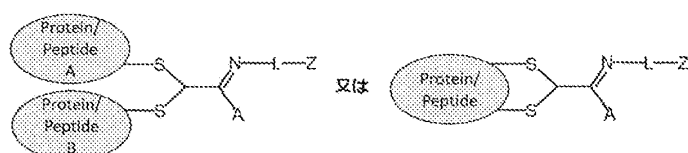


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なっているとしてもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチド

[化9]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なっているとしてもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

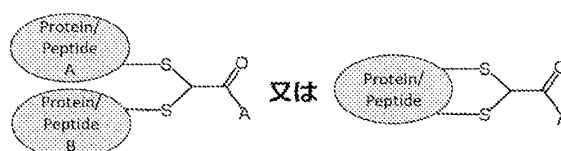
と、当該反応性官能基と反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に前記薬剤を結合させることを含む。

- [0016] 上記本発明の第4～第7の観点に係る方法において、前記リンカーがタンパク質分解酵素により切断可能な部分を含む、こととしてもよい。
- [0017] 上記本発明の第2～第7の観点に係る方法において、前記タンパク質又はペプチドが、5～50アミノ酸のペプチドである、こととしてもよい。
- [0018] 上記本発明の第2～第7の観点に係る方法において、架橋されるチオール基が、単一のタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、こととしてもよい。
- [0019] 上記本発明の第2～第7の観点に係る方法において、前記タンパク質又はペプチドが、Fc結合性ペプチドである、こととしてもよい。
- [0020] 上記本発明の第2～第7の観点に係る方法において、架橋されるチオール基が、分離したタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、こ

としてもよい。

[0021] 本発明の第8の観点に係る架橋されたタンパク質又はペプチドは、以下の式で表される。

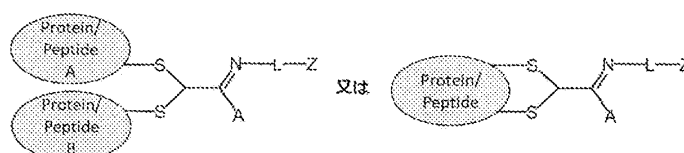
[0022] [化10]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

[0023] 本発明の第9の観点に係る反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドは、以下の式で表される。

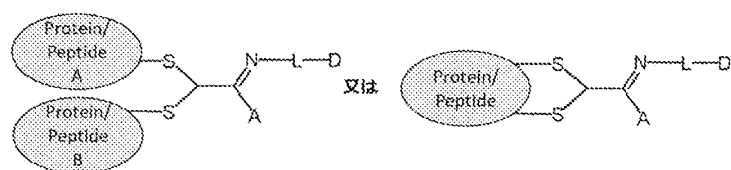
[0024] [化11]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

[0025] 本発明の第10の観点に係るタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体は、以下の式で表される。

[化12]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

- [0026] 本発明の第8及び第9の観点に係るタンパク質又はペプチド、並びに本発明の第10の観点に係る複合体において、前記リンカーがタンパク質分解酵素により切断可能な部分を含む、こととしてもよい。
- [0027] 本発明の第8及び第9の観点に係るタンパク質又はペプチド、並びに本発明の第10の観点に係る複合体において、前記タンパク質又はペプチドが、5～50アミノ酸のペプチドである、こととしてもよい。
- [0028] 本発明の第8及び第9の観点に係るタンパク質又はペプチド、並びに本発明の第10の観点に係る複合体において、架橋されるチオール基が、単一のタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、こととしてもよい。
- [0029] 本発明の第8及び第9の観点に係るタンパク質又はペプチド、並びに本発明の第10の観点に係る複合体において、前記タンパク質又はペプチドがFc結合性ペプチドである、こととしてもよい。
- [0030] Fc結合性ペプチドにおける、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、アルギニン残基又は1位のアミノ酸のアミノ基が、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

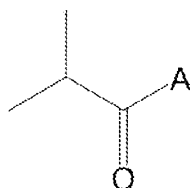
二塩酸塩)、DMS(スベルイミド酸ジメチル二塩酸塩)、DTBP(3、3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル二塩酸塩)、又はDSP(ジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸))で修飾されている、こととしてもよい。

[0031] 本発明の第8及び第9の観点に係るタンパク質又はペプチド、並びに本発明の第10の観点に係る複合体において、架橋されるチオール基が、分離したタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、こととしてもよい。

[0032] 本発明の第11の観点に係る架橋されたFc結合性ペプチドが結合した、IgGのFc領域を有する分子の製造方法は、IgGのFc領域を有する分子と、本発明の第8又は第9の観点に係るタンパク質、ペプチド又は本発明の第10の観点に係る複合体とを接触させることを含む。

[0033] 本発明の第12の観点に係る架橋されたFc結合性ペプチドが結合した、IgGのFc領域を有する分子の製造方法は、IgGのFc領域を有する分子に結合したFc結合性ペプチドと、本発明の第1の観点に係る架橋剤とを反応させて、前記Fc結合性ペプチド中の2つのチオール基を以下の基

[化13]

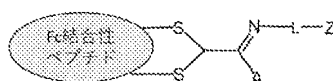


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基である]

を介して互いに結合させることを含む。

[0034] 本発明の第13の観点に係る以下の式で表される反応性官能基Zが結合したFc結合性ペプチド

[化14]

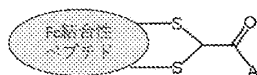


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

が結合した、IgGのFc領域を有する分子の製造方法は、

以下の式で表される架橋されたFc結合性ペプチド

[化15]

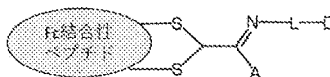


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基である]

が結合した、IgGのFc領域を有する分子と、NH₂-L-Z（Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す）とを反応させることにより、前記架橋されたFc結合性ペプチドにおける架橋部分に反応性官能基を導入することを含む。

[0035] 本発明の第14の観点に係る以下の式で表される薬剤Dが結合したFc結合性ペプチド

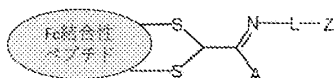
[化16]



が結合した、IgGのFc領域を有する分子の製造方法は、

以下の式で表される反応性官能基Zが結合したFc結合性ペプチド

[化17]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基であり、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

が結合した、I g GのFc領域を有する分子と、当該反応性官能基Zと反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に薬剤を結合させることを含む。

[0036] 上記本発明の第11～14の観点に係る方法は、前記Fc結合性ペプチドと、前記I g GのFc領域を有する分子とを共有結合させることをさらに含む、こととしてもよい。

[0037] 本発明の第15の観点に係るI g GのFc領域を有する分子は、本発明の第8及び第9の観点に係るタンパク質若しくはペプチド、又は本発明の第10の観点に係る複合体が結合している。

[0038] 本発明の第15の観点に係る分子は、前記Fc結合性ペプチドと、前記I g GのFc領域を有する分子とが共有結合している、こととしてもよい。

[0039] 本発明の第16の観点に係る担体は、本発明の第8又は第9の観点に係るペプチドが結合している。

[0040] 本発明の第17の観点に係るI g GのFc領域を有する分子の精製方法は、

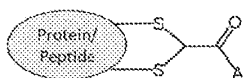
I g GのFc領域を有する分子を含有する液体を上記本発明の第16の観点に係る担体に接触させること、

前記担体に結合しない成分を洗浄して除去すること、及び

前記担体に結合させた成分を溶出させて前記I g GのFc領域を有する分子を回収することを含む。

[0041] 本発明の第18の観点に係る架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法は、以下の式で表されるタンパク質又はペプチドが有する少なくとも2つのチオール基が結合された、架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

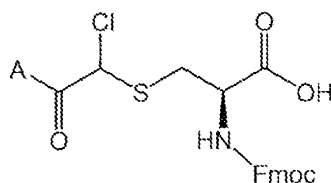
[化18]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基であり、P r o t e i n / P e p t i d eはタンパク質又はペプチドを表す]

前記タンパク質又はペプチドをFmoc法により合成すること、及び
当該合成において、少なくとも1個のシステイン残基の代わりに以下の式

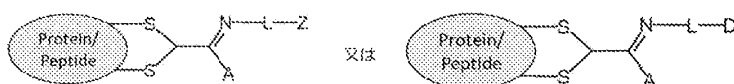
[化19]



で表される化合物を用いることを含む。

[0042] 本発明の第19の観点に係るタンパク質又はペプチドを製造する方法は、
以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造
する方法であって、

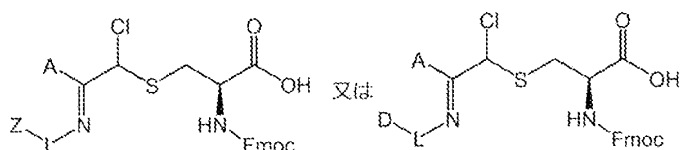
[化20]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基であり、P r o t e i n / P e p t i d eはタンパク質又はペプチドを表し、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表し、Dは薬剤を表す]

前記タンパク質又はペプチドをFmoc法により合成すること、及び
当該合成において、少なくとも1個のシステイン残基の代わりに以下の式

[化21]



で表される化合物を用いることを含む。

発明の効果

[0043] 本発明の方法により得られるアミノ酸におけるS H同士の結合は収率高く架橋構造を形成することができる。また、アルカリ耐性に優れることから、アルカリ条件下に曝されても結合が切断されない。よって、アルカリ耐性の強いタンパク質及びペプチドを提供することができ、アルカリ条件下で使用又は洗浄されるタンパク質及びペプチドに使用することができる。更に、架橋構造によりオリジナルのタンパク質及びペプチドが有していた構造を維持し、機能が損なわれないことから、様々なペプチド及びタンパク質の安定化に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0044] [図1]分子内S S結合の模式図である。Aは天然のタンパク質やペプチドにおけるS S結合を示す。Bは従来技術における架橋結合を示す。Cは本発明の架橋結合を示す。

[図2] 1, 1-ジクロロアセトン架橋ペプチド誘導体固定化カラムを使ったD B Cの評価の結果を表すグラフである。縦軸は280nmにおける吸光度を示し、横軸は溶出時間を表す。破線は10%ブレイクスルーポイントを示す。実線はアルカリ洗浄1回から5回までの結果を表し（濃い線は洗浄回数が多い）点線はアルカリ洗浄10回から30までの結果を表す（濃い線は洗浄回数が多い）。

[図3]アルカリ洗浄によるペプチド固定化カラムのD B Cの変化を表すグラフである。縦軸は変動率（%）を表し、横軸は洗浄回数を表す。

[図4]本発明の架橋ペプチドの模式図である。

[図5]実施例11におけるオキシトシンの架橋反応前及び架橋反応後に係る液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS）での分析の結果を示す図である。A及びBは、それぞれ架橋反応前のオキシトシンSS酸化型及び架橋反応後の反応物の溶出クロマトグラムを示す図である。

[図6]実施例12におけるバゾプレシンの架橋反応前及び架橋反応後に係るLC-MSでの分析の結果を示す図である。A及びBは、それぞれ架橋反応前のバゾプレシンSS酸化型及び架橋反応後の反応物の溶出クロマトグラムを示す図である。

[図7]実施例13における α -キモトリプシンに暴露したオキシトシンSS酸化型の逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析の結果を示す図である。

[図8]実施例13における α -キモトリプシンに暴露したオキシトシンSH還元型の逆相HPLCによる分析の結果を示す図である。

[図9]実施例13における α -キモトリプシンに暴露した2,2-ジクロロアセトフェノン架橋型の反応物の逆相HPLCによる分析の結果を示す図である。

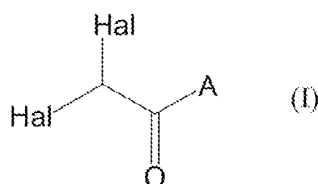
[図10]実施例13における α -キモトリプシン添加後の各分子種の変化量を示す図である。

発明を実施するための形態

[0045]（架橋剤）

一態様におけるタンパク質又はペプチド架橋用架橋剤は、下記式（I）で表される。

[0046] [化22]



[式中、Halはハロゲン原子を表し、2つのハロゲン原子は同一であって

も異なってもよく、Aは、水素原子、フェニル基若しくはハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、又はフェニル基である]

[0047] 本明細書において、「アルキル基」とは、直鎖、分岐、又は環状の飽和炭化水素基を意味する。本明細書においてCは炭素原子数を表し、C 1～6アルキル基とは、炭素原子数が1～6個のアルキル基を示す。アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、2, 3-ジメチルプロピル基、ヘキシル基、及びシクロヘキシル基などが挙げられる。

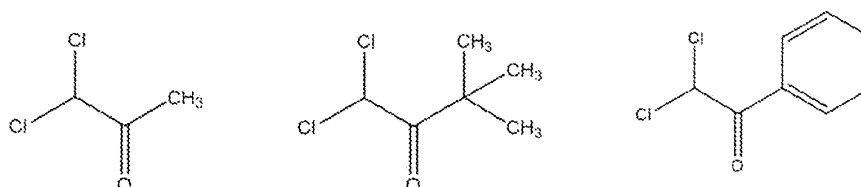
[0048] 基AにおけるC 1～6アルキル基が有する置換基の数は、1～10個、1～8個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、3個、2個、及び／又は1個とすることができ、例えば、トリフルオロメタンを上げることができる。

[0049] 「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、及びヨウ素原子を意味し、好ましくは、フッ素原子、塩素原子、及び臭素原子であり、より好ましくは、フッ素原子、又は塩素原子である。

[0050] 好ましくは、2つのHalは同一のハロゲン原子であり、例えば、いずれもフッ素原子、いずれも塩素原子、又はいずれも臭素原子であってもよい。

[0051] 上記架橋剤としては、例えば、1, 1-ジクロロアセトン、1, 1-ジクロロピナコリン、及び2, 2-ジクロロアセトフェノンを挙げることができる。

[0052] [化23]



[0053] (架橋剤の合成方法)

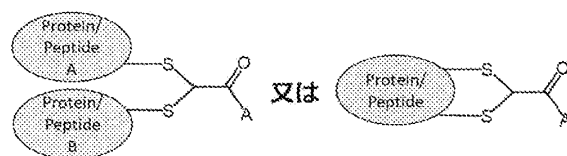
Aがアルキル鎖の場合におけるジクロロ化は、グルッチらの文献 (Gal

lucci, R. R. and Going, R., Journal of Organic Chemistry, 1981, vol. 46, #12, p. 2532-2538) に従って合成することができる。一方、Aがフェニルの場合におけるジクロロ化は、チャンらの文献 (Shao-Lin Zhang, Zheng Yang, Xiaohui Hu, Kin Yip Tam, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 28, Issue 21, 15 November 2018, p. 3441-3445) に従って合成することができる。

[0054] (架橋されたタンパク質又はペプチドの製造方法)

一態様において、架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法は、以下の式で表される単一の又は分離したタンパク質又はペプチドが有する少なくとも2つのチオール基が結合された、架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

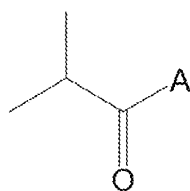
[化24]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

タンパク質又はペプチドを本実施の形態に係る架橋剤と反応させて、前記2つのチオール基が以下の基

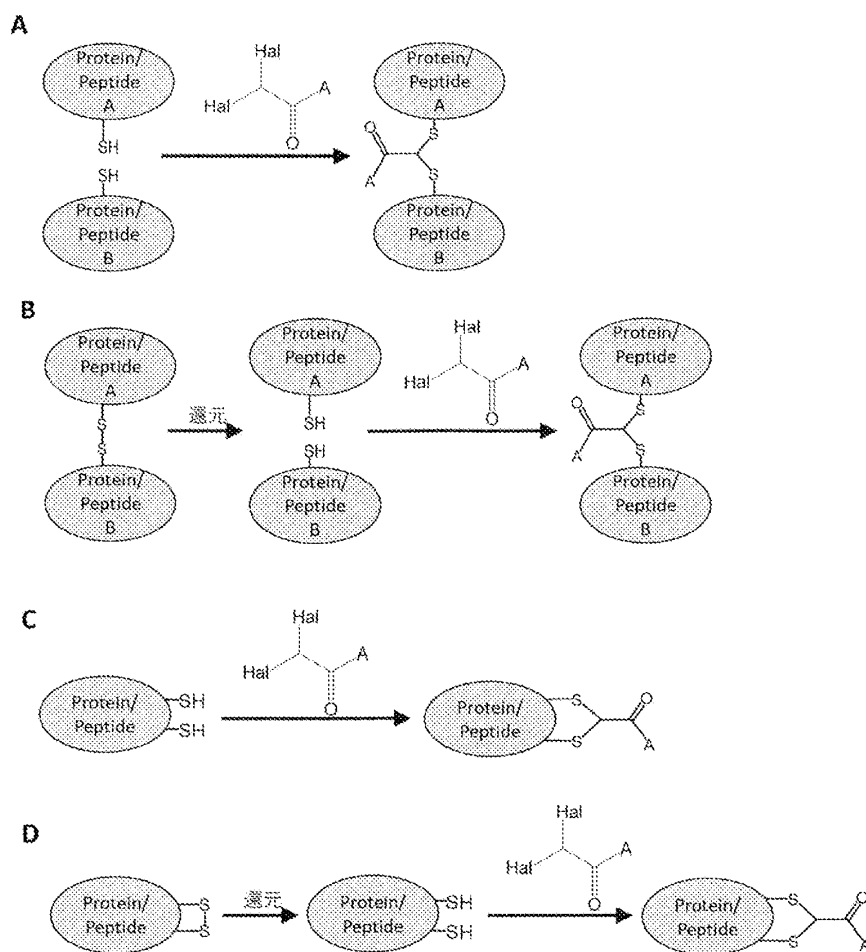
[化25]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基である]
を介して互いに結合させることを含む。

[0055] 架橋されたタンパク質の製造方法は、例えば、以下の反応式で表すことができる。

[0056] [化26]



- [0057] 架橋剤とチオール基との間の架橋反応は、必要に応じて、PBSなどの緩衝液で溶解したTCEP・HCIなどを加えて室温で30分間～1日攪拌して還元させることによりジスルフィド結合を切断してSH基を生じさせたタンパク質又はペプチド溶液に、アセトニトリルに溶解した架橋剤を加えて、室温で30分間～1日間攪拌して行うことができる。反応溶液は、必要に応じてHPLC等で精製することができる。原料となるタンパク質又はペプチドは必要に応じてFmocで保護されていてもよく、その場合には、反応後のタンパク質又はペプチドのFmoc保護基を脱保護するために、ピペリジンなどの塩基を添加する。反応溶液は、必要に応じて、更にHPLC（C18逆相カラム）で精製することができる。架橋されたタンパク質又はペプチドが生じているか否かは、例えば、LC-MS分析により分子量を確認することで確認することができる。
- [0058] 本実施の形態に係る架橋剤は分離した2つのタンパク質又はペプチドに存在するSH基同士を架橋してもよく、この場合には、2つのタンパク質又はペプチドを架橋剤と反応させて結合させる（A）。2つの分子は、同一種類の分子であってもよいし、異種類の分子であってもよい。あるいは、本架橋方法は、単一分子内に存在する2つのSH基を架橋してもよく、この場合には、1つのタンパク質又はペプチドを架橋剤と反応させて架橋する（C）。
- [0059] 本明細書の架橋剤は2つのチオール基同士を架橋する。「チオール基」又は「SH基」は、通常はタンパク質又はペプチドを構成するシステイン残基に由来するが、人工アミノ酸を利用するなどして、人工的に導入された基であってもよい。2つのチオール基は、天然又は架橋前の状態においてジスルフィド結合を形成していてもよいし、ジスルフィド結合を形成していなくてもよい。
- [0060] 2つのチオール基が、天然又は架橋前の状態においてジスルフィド結合を形成している場合、上記架橋方法を実施する前に当該ジスルフィド結合を還元してチオール基を生じさせる工程を含んでいてもよい（B及びD）。例えば、ジスルフィド結合の還元は、例えば、トリス（2-カルボエトキシ）ホ

スフィン（TCETP）、その塩酸塩、ジチオエタノール（DTT）、2-メルカプトエタノール、及びシステインハイドロクロライド（Cys-HCl）などの市販のタンパク質ジスルフィド用還元剤を用いて行うことができる。また、2つのチオール基は、単一のタンパク質又はペプチドに含まれるシステイン残基に存在するチオール基であってもよいし、分離したタンパク質又はペプチド（タンパク質同士、ペプチド同士、タンパク質とペプチドの組み合わせを含む）のチオール基であってもよい。単一のタンパク質又はペプチド内でジスルフィド結合を形成するチオール基を架橋する場合、当該架橋後の構造が前記ジスルフィド結合と同様の立体構造を与えることが望ましい。

[0061] 架橋されるタンパク質又はペプチドは、それぞれ、分子内架橋の場合には少なくとも2個、分子間架橋の場合には少なくとも1個のSH基を有する。タンパク質又はペプチド例えば、分子内又は分子間に1個以上（例えば、1～10個、2～8個、4～6個、1個、2個、3個、4個、5個、又は6個）のジスルフィド結合を有していてもよい。例えば、該タンパク質は、500Da以上、1000Da以上、2000Da以上、かつ／又は、500,000Da以下、200,000Da以下、又は100,000Da以下のタンパク質であってもよい。例えば、このようなタンパク質として、酵素、糖タンパク質（エリスロポエチンなど）、サイトカイン、トキシン、アジュバント、構造タンパク質、抗体、Fc融合タンパク質、抗体断片（F(ab')₂、Fab'、Fab、Fab₃、一本鎖Fv（scFv）、（タンデム）バイスペシフィック一本鎖Fv（sc（Fv）₂）、一本鎖トリプルボディ、ナノボディ、ダイバレントVHH、ペンタバレントVHH、ミニボディ、（二本鎖）ダイアボディ、タンデムダイアボディ、バイスペシフィックトリボディ、バイスペシフィックバイボディ、デュアルアフィニティリターゲティング分子（DART）、トリアボディ（又はトリボディ）、テトラボディ（又は[sc（Fv）₂]₂）、若しくは（scFv-SA）₄）ジスルフィド結合Fv、コンパクトIgG、重鎖抗体、又はそれらの重合体など）であっ

てもよい。また、例えば、ペプチドは、5～5000アミノ酸、5～1000アミノ酸、5～500アミノ酸、5～100アミノ酸、5～50アミノ酸、又は10～40アミノ酸のペプチドであってもよい。また、ペプチドは、環状又は線状のいずれであってもよい。このようなペプチドとしては、ワクチン、マイクロ抗体、及び抗菌性ペプチドなどが挙げられる。本明細書において、抗体のFc領域を含むタンパク質及びペプチドを「抗体等」という。

[0062] 上記の架橋方法は、単一又は同一の架橋構造を形成してもよいし、複数の架橋構造を形成してもよい。複数のタンパク質又はペプチド間を架橋することにより、同一又は異なる3つ以上のタンパク質及び／又はペプチドを架橋してもよい。また、分子内架橋と分子間架橋とが組み合わされて架橋されていてもよく、例えば、後述のFc結合性ペプチド内の分子内架橋と、当該ペプチドと抗体のFc領域との間の分子間架橋の2種類の架橋を行ってもよい。

[0063] (ペプチド合成による架橋されたタンパク質又はペプチドの製造方法)

あるいは、別の態様に係る架橋方法は、以下の式で表されるタンパク質又はペプチドが有する少なくとも2つのチオール基が結合された、架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

[化27]

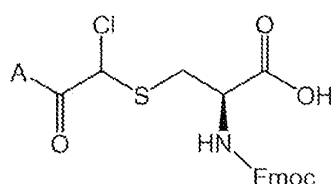


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表す]

タンパク質又はペプチドをFmoc法により合成すること、及び

当該合成において、少なくとも1個のシステイン残基の代わりに以下の式

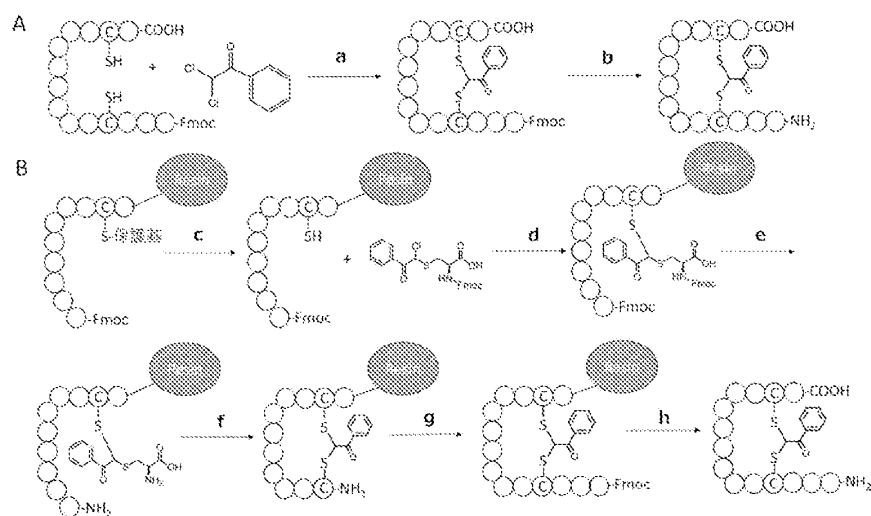
[化28]



で表される化合物を用いることを含む。より具体的には、本方法は、ペプチド合成樹脂（レジン）などの担体上でFmoc法にて、C末端から、架橋しようとする2つCysを含むペプチドを合成する。最初のCysの結合は、通常のCys（必要に応じてSH基が保護されていてもよい）を用いて行い、残りのもう一方のCysの1つ前のアミノ酸までを通常のFmoc法で合成する。合成途中のペプチドに含まれるCysが保護されている場合には保護基を脱保護後、1, 1-ジクロロアセトン誘導体（1, 1-ジクロロアセトン、1, 1-ジクロロピナコリン、又は2, 2-ジクロロアセトフェノンなど）がSH基において結合したFmoc化システイン（例：Fmoc化クロロアセトフェノイルシステイン）を添加し連結させる（スキームBの工程d）。Fmocを脱保護し（スキームBの工程e）、生じたペプチドのN末端αアミノ基とアセトフェノイルシステイン側のαカルボキシル基をカップリングさせる（スキームBの工程f）ことにより、1, 1-ジクロロアセトン誘導体がSH基において結合したシステインがペプチド鎖に結合する。残りのアミノ酸をFmoc法にて連結合成し（スキームBの工程g）、架橋されたペプチド鎖が完成する。

[0064]

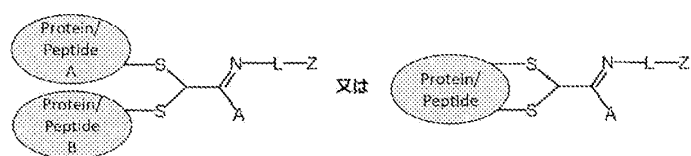
[化29]



[0065] (反応性官能基導入方法)

上記方法により得られた架橋剤には、更に反応性官能基を導入することができる。よって、一態様におけるタンパク質又はペプチドを製造する方法は、以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

[化30]



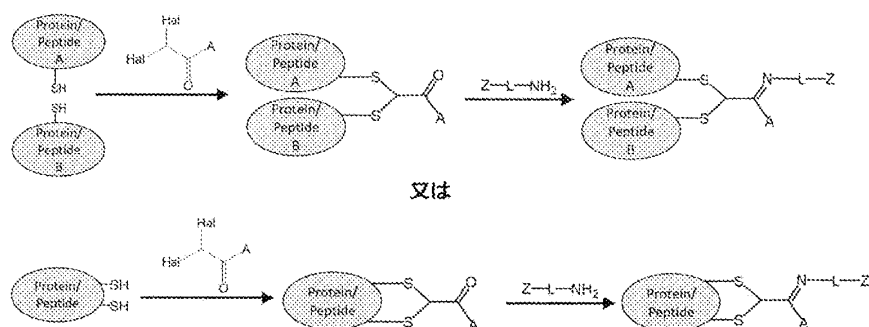
[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

前記方法により架橋されたタンパク質又はペプチドを得ること、

得られた架橋されたタンパク質又はペプチドと $\text{NH}_2\text{-L-Z}$ (Lはリンカ

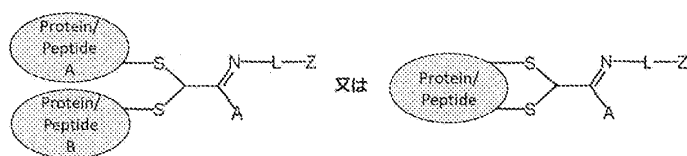
ーを表し、Zは反応性官能基を表す)とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に反応性官能基を導入することを含む。

[0066] [化31]



[0067] あるいは、別の態様では、反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法は、既に架橋された物質を使用して行うことができる。よって、別の態様では、反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

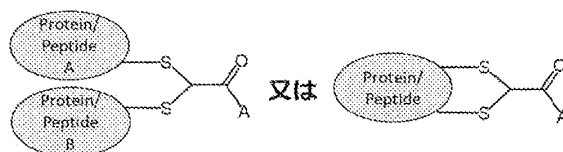
[化32]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

以下の式で表される架橋されたタンパク質又はペプチド

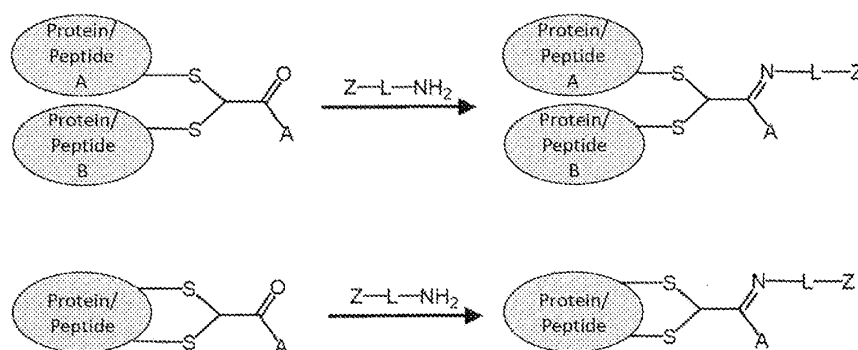
[化33]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

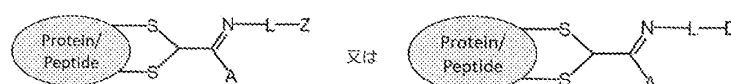
と、 $\text{NH}_2\text{---L---Z}$ （Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す）とを反応させることにより、上記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に反応性官能基を導入することを含む方法であってもよい。

[0068] [化34]



[0069] また、別の態様におけるタンパク質又はペプチドを製造する方法は、以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

[化35]

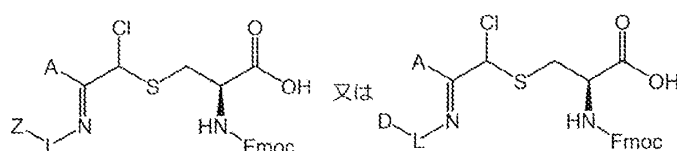


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表し、Dは薬剤を表す]

上記タンパク質又はペプチドをFmoc法により合成すること、及び

当該合成において、少なくとも1個のシステイン残基の代わりに以下の式

[化36]



で表される化合物を用いることを含む。本方法は、使用するシステイン残基が上記化合物である点を除いては、上記（ペプチド合成による架橋されたタンパク質又はペプチドの製造方法）と同様の方法で行うことができる。

[0070] （反応性官能基）

具体的には、反応性官能基は、本実施の形態に係る架橋剤で架橋されたタンパク質又はペプチドと、該反応性官能基を有するアミノ化合物（ $\text{NH}_2\text{--L--Z}$ ）とを反応させてオキシムを形成させる（オキシム法）ことにより導入することができる。使用する反応性官能基を有するアミノ化合物は、 $\text{NH}_2\text{--X--L'--Z}$ とすることができる（ここで、Xは、O、NH、又はN（C1～4アルキル）である）。

[0071] （リンカー）

本明細書においてL及びL'はリンカーを表す。本明細書において「リンカー」は、リンカーに結合する反応性官能基や薬剤と架橋されたタンパク質やペプチドが結合可能な長さであって、架橋反応に影響を及ぼさない構造であれば特に限定されるものではなく、存在しなくてもよい（結合を示してもよい）。一例として、リンカーは、1つまたは複数のアルキレン、アルケニレン、及びアルキニレンを含んでいてもよい。前記アルキレン、アルケニレ

ン、及びアルキニレンは、直鎖、分岐、環状であってもよい。アルキレンにおける炭素原子数は、1～20、1～10、1～6、1～4、1～3、1～2、2、又は1個とすることができ、アルケニレン、及びアルキニレンにおける炭素原子数は、2～20、2～10、2～6、2～4、2～3、又は2個とすることができる。また、リンカーは、1つまたは複数の $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-N((C1\sim C6)\text{アルキル})-$ 、 $-NH-C(O)-NH-$ 、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、フェニレン、ヘテロアリーレン、及び／またはヘテロシクレンを含んでもよい。更に、リンカーは、1つまたは複数のアミノ酸部分を含んでもよく、例えば1～100、1～50、1～25、1～20、1～15、1～10、1～5、1～4、1～3、1～2、2、又は1個のアミノ酸部分を含んでもよい。リンカーを構成する基において、炭素原子に結合する水素原子は、ハロゲン原子で置換されていてもよい。本架橋剤が最終的に薬剤と結合し、当該薬剤が特定の条件下で放出されることを目的とする場合（例えば、本架橋剤が特定の標的に対して指向性をもつペプチド又はタンパク質（例えば、Fc領域を有する分子など）と結合し（例えば、抗体薬物複合体（ADC）など）、当該標的に富む局所で薬剤を放出することを意図する場合）リンカーは好ましくは生体内の特定の条件、好ましくは、当該局所に特徴的な条件により切断可能な部分を含む。このような条件とは、例えば、酵素の存在やpHなどが挙げられる。例えば、リンカーは、プロテアーゼまたはエステラーゼにより切断されるペプチド結合（例えば、リソソーム酵素により切断されるGGFGなど、Marcin Poreba、The FEBS Journal（2020）287：1936－1969参照）またはエステルを含んでもよい。この場合、リンカーは上記プロテアーゼにより切断されるペプチド結合以外のアミノ酸部分を含んでもよい。

[0072] 本明細書において、「アルキレン」とは、前記アルキル基から水素原子1個を除いた2価の基を表す。アルキレン基としては、C1～20直鎖又は分岐アルキレン及びC3～7シクロアルキレンが挙げられ、例えば、メチレン

基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、及びシクロヘキシレン基が挙げられる。アルキレンは、必要に応じて、水酸基、ハロゲン原子、及びアミノ基などで置換されていてもよく、この場合、アルキレンが有する置換基の数は、1～10個、1～8個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、3個、2個、及び／又は1個とすることができる。

[0073] 「アルケニレン」とは、1つ以上の炭素－炭素間の二重結合を有する直鎖、分岐、又は環状の不飽和炭化水素の任意の炭素原子から2個の水素原子を除去してなる2価の基を意味する。アルケニレンとしては、C₂～C₂₀アルケニレンが挙げられ、例えば、ビニレン、プロペニレン、イソプロペニレン、ブテニレン、ペンテニレン、ヘキセニレン、ヘプテニレン、オクテニレン、ノネニレン、及びデセニレンが挙げられる。

[0074] 「アルキニレン」1以上の炭素－炭素間の三重結合を有する直鎖又は分岐状の不飽和炭化水素の任意の炭素原子から2個の水素原子を除去してなる2価の基を意味する。アルキニレンとしては、C₂～C₂₀アルキニレンが挙げられ、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、及びフェニルエチニレンが挙げられる。

[0075] 「ヘテロアリーレン」及び「ヘテロシクレン」は、それぞれ、芳香族及び非芳香族の、窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から選択される1種類以上のヘテロ原子を少なくとも1個含む5～14員の2価の単環式又は縮合複素環基を意味する。5～14員の複素環基が含有するヘテロ原子の数は、例えば、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、2個、又は1個であってよい。単環式複素環基は、好ましくは、5～6員環である。縮合複素環基は、好ましくは、8～10員環である。ヘテロアリーレン及びヘテロシクレンとしては、例えば、ピペリジレン、ピペラジレン、モルホリレン、キヌクリジレン、ピロリジレン、アゼチジレン、オキセチレン、アジリジニレン、トロパニレン、フリレン、テトラヒドロフリレン、チエニレン、ピロリレン、ピロリニレン、ピロリジニレン、ジオキサニレン、オキサゾリレン、オキサ

ゾリニレン、イソオキサゾリレン、チアゾリレン、チアゾリニレン、イソチアゾリレン、イミダゾリレン、イミダゾリニレン、イミダゾリジニレン、オキサゾリジニレン、チアゾリジニレン、ピラゾリレン、ピラゾリニレン、ピラゾリジニレン、オキサジアゾリレン、フラザニレン、チアジアゾリレン、トリアゾリレン、テトラゾリレン、ピラニレン、ピリジレン、ピペリジニレン、ピリダジニレン、ピリミジニレン、ピラジニレン、ピペラジニレン、ジオキサニレン、オキサジニレン、モルホリニレン、チアジニレン、トリアジニレン、ベンゾフラニレン、イソベンゾフラニレン、ジヒドロベンゾフラニレン、ジヒドロイソベンゾフラニレン、ベンゾチエニレン、イソベンゾチエニレン、ジヒドロベンゾチエニレン、ジヒドロイソベンゾチエニレン、テトラヒドロベンゾチエニレン、キノリレン、イソキノリレン、キナゾリニレン、フタラジニレン、プテリジニレン、クマリレン、クロモニレン、インドリレン、イソインドリレン、ベンズイミダゾイレン、ベンゾフリレン、プリニレン、アクリジニレン、フェノキサジニレン、フェノチアジニレン、ベンゾオキサゾリレン、ベンゾチアゾリレン、インダゾリレン、ベンズイミダゾリレン、ベンゾジオキサラニレン、ベンゾジオキサニルクロメニレン、クロマニレン、イソクロマニレン、クロマノニレン、シンノリニレン、キノキサリニレン、インドリジニレン、キノリジニレン、イミダゾピリジレン、ナフチリジニレン、ジヒドロベンゾオキサジニレン、ジヒドロベンゾオキサゾリニレン、ジヒドロベンゾオキサジノニレン、及びベンゾチオキサニレンを挙げることができる。

[0076] 本明細書において「含む」の語は、「からなる」場合を含む意図で記載されており、「からなる」と読み替えることができる。

[0077] 本明細書において、「反応性官能基」又は「Z」で表される基は、比較的穏やかな条件下で、ペプチド、タンパク質、核酸、又は低分子医薬などと反応して結合することができる基を意味する。反応性官能基としては、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、アルファーハロカルボニル、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）、アジド、カルボキシ、トシル、アミノ、エポキシ、アシル、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジド、NHSエステル、酸塩化物、アルデヒド、グリオキサール、エポキシド、オキシラン、カーボネート、アリール化剤、イミドエステル、カルボジイミド、酸無水物、ハロアセチル、アルキルハロゲン化物、マレイミド、アジリジン、アクリロイル誘導体、アリール化剤、ジアゾアルカン、ジアゾアセチル化合物、カルボニル、ケトン、カルボジイミド、エポキシド、オキシラン、カルボニルジイミダゾール、N, N'-ジスクシンイミジルカーボネート、クロロギ酸N-ヒドロキシスクシンイミジル、ハロゲン化アルキル、イソシアネート、ヒドラジン、シッフ塩基、還元のアミノ化生成物、マンニッヒ縮合生成物、ジアゾニウム誘導体、マンニッヒ縮合生成物、ヨウ素化反応生成物、アリールアジド、ハロゲン化アリールアジド、ベンゾフォノン、ジアゾ化合物、及びジアジリン誘導体などを挙げることができる。

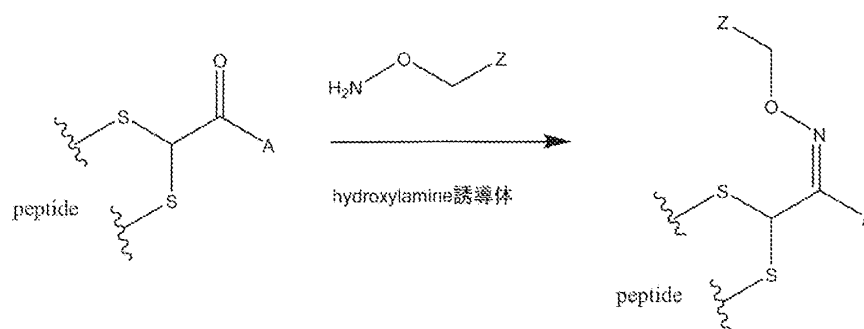
[0078] 反応性官能基としては、薬物との結合形態としてアミド結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、チオエステル結合、ヒドラゾン結合、エステル結合、エーテル結合又はウレタン結合による共有結合をもたらす基であってもよい。例えば、第一級アミンとの反応に適するものとしてはN-スクシンイミジルエステル又はN-スルホスクシンイミジルエステルがあり、アミノ基との反応に適するものとしてはp-ニトロフェニルエステル、ジニトロフェニルエステル又はペンタフルオロフェニルエステルがあり、メルカプト基との反応に適するものとしてはマレイミド基、カルボン酸塩化物、ピリジルジチオ基、ニトロピリジルジチオ基、ハロアルキル基、及びハロアセチル基があり、ヒドロキシ基との反応に適するものとしては、イソシアネート基（

isocyanate) ものがあ (Greg t. Hermanson, Bioconjugate Techniques Second Edition, p234-345)。

[0079] 更に、反応性官能基は、アルコキシアミンとの反応によりオキシム結合が形成される反応、Cu(I) 触媒でアルキン (alkyne) 又はアジド (azide) に反応するヒュスゲンの1, 3-双極子環化付加反応 (「Click」反応)、逆電子要請型Diels-Alder反応、マイケル反応、メタセシス反応、遷移金属触媒によるクロスカップリング反応、ラジカル重合反応、酸化カップリング反応、アシル転移反応又はフォトクリック反応に関与する (当該反応が可能である) 反応性官能基も含む (Kim CH et al, Curr Opin Chem Biol, 2013 Jun; 17 (3) : 412-9)。

[0080] 一例として、反応性官能基導入は、架橋剤を介して互いに結合した上記タンパク質又は上記ペプチド又はその融合物と、ヒドロキシアミン誘導体とをPBS (pH 7. 4) などの緩衝液中にて4℃から常温のいずれかの環境下で30分～一晩反応させることによりアルキン基などの反応性官能基を導入することにより行うことができる。

[0081] [化37]



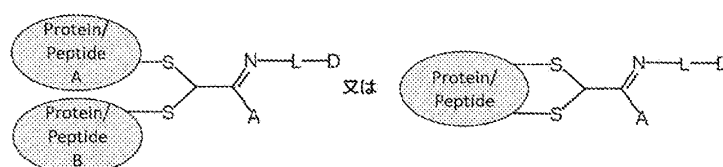
[0082] (薬剤結合方法)

本実施の形態に係る架橋剤を利用して、タンパク質又はペプチド又はその融合物に薬剤 (ペイロード) を導入することができる。具体的には、上記反

応性官能基を導入したタンパク質又はペプチド又はその融合物の反応性官能基と薬剤（ペイロード）とを反応させて結合させることにより、タンパク質又はペプチド又はその融合物に薬剤（ペイロード）を導入することができる。

[0083] よって、一態様においてタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法は、以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法であって、

[化38]



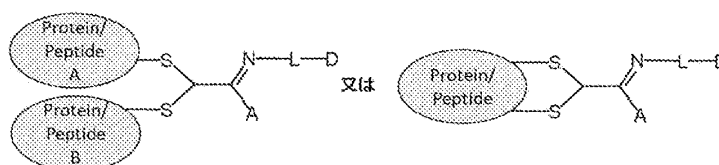
[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

前記方法により反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを得ると、

得られた反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドと、当該反応性官能基と反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に薬剤を結合させることを含む。

[0084] あるいは、上記タンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法は、既に反応性官能基が導入されたタンパク質及び／又はペプチドを使用して製造することができる。よって、別の態様におけるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法は、以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法であって、

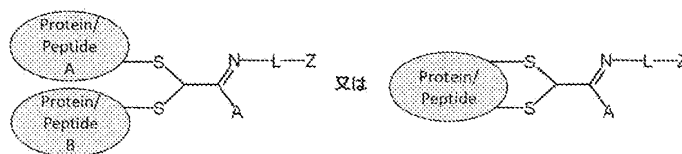
[化39]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチド

[化40]

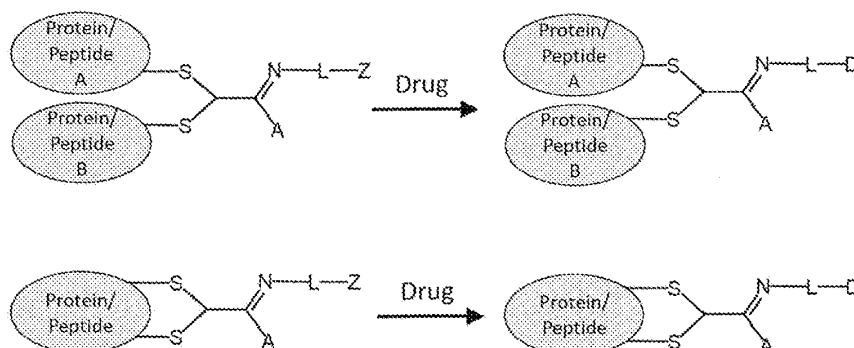


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

と、当該反応性官能基と反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、上記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に薬剤を結合させることを含む。

[0085]

[化41]

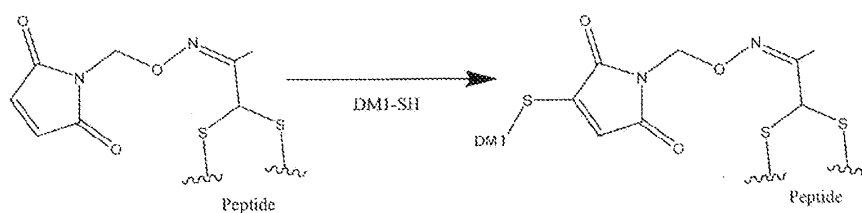


[0086] 本明細書において「薬剤」は、タンパク質又はペプチドに導入して利用される薬剤であれば特に限定されるものではないが、例えば、治療剤、予防剤、標的化剤、標識剤、又は診断剤が挙げられる。例えば、治療剤又は予防剤としては、モノメチルオーリスタチン、オーリスタチン、メイタンシン、エムタンシン、ドキシソルピシン、ブレオマイシン、オゾガマイシン、ベドチン、パストックス、デルクステカン、マイタンシノールカリケアミシン、エキサテカン、ピロロベンゾジアゼピン二量体、デュオカルマイシン、エリブリン、SN-38、PNU-159682、エムタンシン（DM1）、メルタンシン又はこれらの誘導体等の抗がん剤； ^{90}Y などのラジオアイソトープ；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；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；放射能標識、酵素、蛍光標識、生物発光標識、及び化学発光標識金属等の検出可能な標識を挙げることができる。

[0087] 一例として、予めオキシム反応により、反応性官能基としてマレイミド基を導入したタンパク質又はペプチド又はその融合物と、薬剤として抗癌剤であるメルタンシンのSH基にアジド基を導入したものをPBS（pH 7.4）などの緩衝液中にて4℃から常温のいずれかの環境下で30分～一晩反応させることにより薬剤を導入することができる。

[0088]

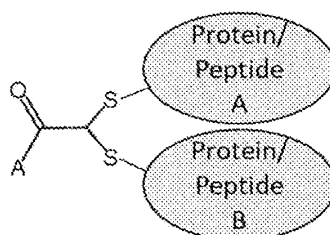
[化42]



[0089] (架橋されたタンパク質又はペプチド)

一態様では、上記架橋剤で架橋されたタンパク質及び／又はペプチドが提供される。別の態様では、分離したタンパク質及び／若しくはペプチドに存在する2つのチオール基が上記架橋剤を介して互いに結合した、以下の構造を有する融合タンパク質又は融合ペプチドが提供される。以下において、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは、互いに異なる物質であってもよいし、同じ物質であってもよい。

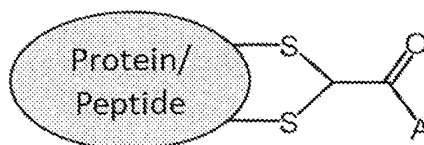
[0090] [化43]



[式中、Aは式(1)と同様に定義される]

【0091】 また、別の態様では単一のタンパク質又はペプチド内に存在する２つのチオール基が本発明の架橋剤を介して互いに結合した、以下の構造を有するタンパク質又はペプチドが提供される。

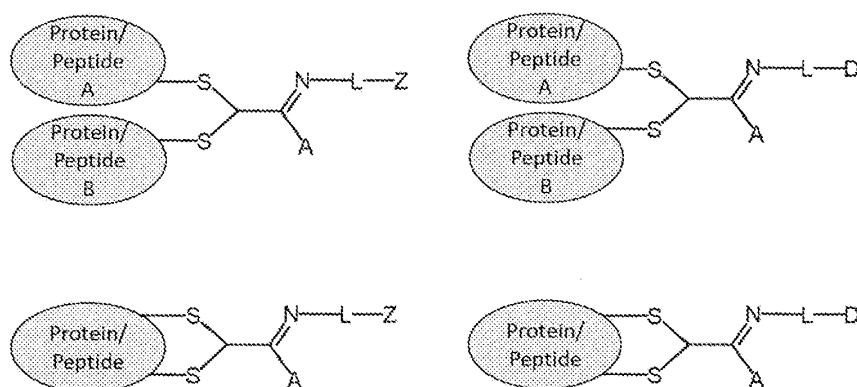
[0092] [化44]



[式中、Aは式(1)と同様に定義される]

[0093] 本実施の形態に係る架橋剤が反応性官能基又は薬剤と結合していることにより、所望のタンパク質、ペプチド又はそれらの複合体に対して官能基や薬剤を導入することができる。よって、上記架橋タンパク質及びペプチドは、架橋剤を介して反応性官能基が結合したタンパク質若しくはペプチド、又は架橋剤を介して薬剤が結合したタンパク質又はペプチドであってもよく、以下で表される分子を含む。

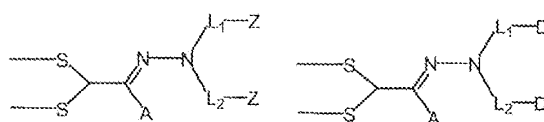
[0094] [化45]



[式中、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表し、Dは薬剤を表す]

[0095] 本明細書においてリンカーは、分岐構造を有することにより、複数の官能基Z又は薬剤Dと結合することができる。本実施の形態に係る架橋剤に結合する官能基Z又は薬剤Dの数は、1～20個、1～10個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、又は1個とすることができる。例えば、官能基Z又は薬剤Dの数が2個である場合、以下の構造とすることができる（L1及びL2は、リンカーを表す。リンカーは上述の定義と同様である。）。

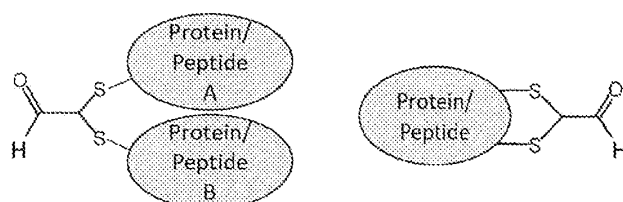
[0096] [化46]



[0097] 本実施の形態に係る架橋剤は、所望のタンパク質、ペプチド又はそれらの

複合体の結合安定性強化を目的として使用することができる。例えば、上記架橋タンパク質又はペプチドは、基Aが水素原子であってよく、以下で表される分子を含む。

[0098] [化47]



[0099] 上述において、リンカーL、反応性官能基Z、薬剤Dは上記のものと同様である。架橋された分子は、ジスルフィド結合と比較してアルカリ耐性が改善され、安定化された分子である。また、上述の架橋剤を介した結合は、1つであってもよいし、2つ以上であってもよい。2つ以上の架橋が存在する場合、単一タンパク質又はペプチド内の架橋であってもよいし、分離したタンパク質及び／又はペプチド内の架橋であってもよいし、単一タンパク質又はペプチド内の架橋と分離したタンパク質及び／又はペプチド内の架橋が組み合わされていてよい。分離したタンパク質又はペプチド内の架橋が2つ以上存在する場合、同じ2つのタンパク質及び／又はペプチド間を架橋されていてよいし、複数のタンパク質及び／又はペプチド間が架橋されて3つ以上のタンパク質及び／又はペプチドが架橋により結合していてもよい。

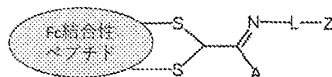
[0100] (架橋Fc結合性ペプチド)

本明細書において架橋されるペプチドは、Fc結合性ペプチドであってもよい。よって、別の態様では、以下の式(式中、A、L、Z、及びDは、上述の定義と同様)で表される、上記架橋剤で架橋されたFc結合性ペプチド又はその製造方法が提供される。

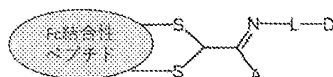
[0101] [化48]



[0102] [化49]



[0103] [化50]



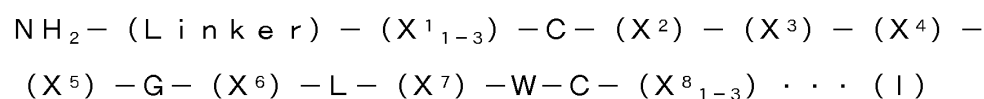
[0104] 本明細書において、「Fc結合性ペプチド」とは、IgGのFc領域に特異的に結合するペプチドを意味する。本明細書において、「IgGのFc領域」とは、典型的には、IgGのタンパク分解酵素パパイン処理物として得られるC末端側の断片を意味する。Fc結合性ペプチドとして、好ましくは、FcにおけるEu numberingに従うLys248、Lys246、Lys338、Lys288、Lys290、Lys360、Lys414、及びLys439から選択される部位及び／又はその近接領域、好ましくはLys248及び／又はその近接領域に結合するか、あるいは、プロテインAの結合領域に結合するペプチドである。例えば、Fc結合性ペプチドは、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公開第2008/054030号、国際公開第2013/027796号、国際公開第2016/186206号、国際公開第2018/230257号、及びKyoh ei Mugurumaら、ACS Omega (2019) ; 4 (11) : 14390-14397. 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。Fc結合性ペプチドは、好ましくは、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が本明細書の架橋剤により架橋される。

[0105] 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

I g Gであってよく、好ましくはヒトのI g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4)である。本明細書におけるI g Gとして好ましくは、ヒトI g G 1、I g G 2、若しくはI g G 4、又はウサギI g Gであり、特に好ましくはヒトI g G 1、I g G 2、又はI g G 4である。

[0106] 具体的には、Fc結合性ペプチドは、以下の(i)～(iv)から選択されるペプチドであってもよい：

(i) 下記式(1)で表されるペプチド：



[式(1)において、(Linker)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D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、Tle、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]；

(ii) 下記式(11)で表されるペプチド、又は(11)のアミノ酸配列において、 $\text{X}^9 \sim \text{X}^{13}$ 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(11)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、 β Ala-F、2-アミノスベリン酸-F、Dpr

—F、及びNH₂—(PEG)_n—CO (n=1~50)—F、F、K、Orn、C、D、E、2-アミノスベリン酸残基、及びDprからなる群から選択され、

X¹¹及びX¹²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る] ;

(iii) 下記式(I')又は(I'')で表されるペプチド:

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

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

[式(I')及び式(I'')において、

Zは反応性官能基を表し、

(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X¹、X²、X³及び各X⁸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、

X⁴は、H、R、S、又はDであり、

X⁵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、Tle、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、

X⁶は、E、N、R、又はDであり、

X⁷は、I又はVである]

(iv) 下記式(III')で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、又は(III')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

:

$$X^{9}_{1-2}NMQCQX^{14}RFYEALHDPNLNEEQRNAX^{11}IX^{12}S$$

$$IRDDC-(\text{Linker } 2)-NH_2 \text{ (配列番号 3)} \cdots (II')$$

[式 (II')] 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、 β Ala-F、2-アミノスベリン酸-F、Dpr-F、及び $NH_2-(PEG)_n-CO$ ($n=1\sim 50$)-F、F、K、Orn、C、D、E、2-アミノスベリン酸残基、Dpr、及び Acetyl-K からなる群から選択され、

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^{14} は、R、C、K (Z) であり、

Z は反応性官能基である]。

[0107] 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「 $p-q$ 」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。また、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、D a bは2、4-ジアミノ酪酸残基であり、N l eはノルロイシン残基であり、N v aはノルバリン残基であり、T l eはt e r t -ロイシン残基であり、A l a (t - B u) はt e r t -ブチルアラニン残基であり、かつ、C h a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A c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、A c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。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 (A z i d e) である。K (A z i d e) はアジド結合リシン残基を表す。

[0108] 本明細書において、F c結合性ペプチドは、担体に結合させて抗体と担体とを結合させることを目的とする担体結合用ペプチドであってもよいし、ペプチドを介して薬剤を抗体に結合させることを目的とする薬剤結合用ペプチドであってもよい。担体結合用ペプチドの場合、上述の(i)又は(ii)のペプチドが好ましい。

[0109] 式(1)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(-C O O H)に、アミノ基が結合して(-C(=O) N H₂)基となってもよく、任意で該カルボキシル末端とアミノ基との間にL i n k e r（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L i n k e rが存在する場合、N末端側のL i n k e r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)-(L i n k e r)-N H₂となってもよい。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L i n k e r中のN

末端近傍の適切な位置にL y s 残基が導入される)。

[0110] 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] X^1_{1-3} が、(S、G、F、又はなし)－(D、G、A、S、P、Hc y、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] X^1_{1-3} が、D、GPD、R、GPR、SPD、GDD、GPS、SD D、RGN、G－Hc y－D、RGP、又はGPDである。

[3] X^1_{1-3} が、D又はGPDである。

[4] X^2 が、A、S、又はTである。

[5] X^2 が、A又はTである。

[6] X^2 が、Aである。

[7] X^3 が、Y又はWである。

[8] X^3 が、Yである。

[9] X^4 が、Hである。

[10] X^5 が、A、R、K、C、D、E、L、2－アミノスベリン酸、Dp r、R、F、2－アミノスベリン酸、Dp r、AcOr n、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] X^5 が、K、R、AcOr n、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。

[0111] 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。

[0112] 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－ NH_2 基又は NH_2 －(Linker)－基を有していてもよい）：

- 1) DCAYHX⁵GELVWCT (配列番号4)
- 2) GPDCA YHX⁵GELVWCTFH (配列番号5)
- 3) RCAYHX⁵GELVWCS (配列番号6)
- 4) GPRCA YHX⁵GELVWCSFH (配列番号7)
- 5) SPDCAYHX⁵GELVWCTFH (配列番号8)
- 6) GDDCA YHX⁵GELVWCTFH (配列番号9)
- 7) GPSCAYHX⁵GELVWCTFH (配列番号10)
- 8) GPDCA YHX⁵GELVWCSFH (配列番号11)
- 9) GPDCA YHX⁵GELVWCTHH (配列番号12)
- 10) GPDCA YHX⁵GELVWCTFY (配列番号13)
- 11) SPDCAYHX⁵GELVWCTFY (配列番号14)
- 12) SDDCA YHX⁵GELVWCTFY (配列番号15)
- 13) RGNCA YHX⁵GQLVWCTYH (配列番号16)

- 14) G-Hcy-DCAYHX⁵GELVWCT-Hcy-H (配列番号 17)
- 15) RRGPDCA YHX⁵GELVWCTFH (配列番号 18)
- 16) DCTYHX⁵GNLVWCT (配列番号 19)
- 17) DCAYHX⁵GNLVWCT (配列番号 20)
- 18) DCTYHX⁵GELVWCT (配列番号 21)
- 19) DCAWHX⁵GELVWCT (配列番号 22)
- 20) DCTYTX⁵GNLVWCT (配列番号 23)
- 21) DCAYTX⁵GNLVWCT (配列番号 24)
- 22) DCSYTX⁵GNLVWCT (配列番号 25)
- 23) DCTWTX⁵GNLVWCT (配列番号 26)
- 24) DCTYHX⁵GNLVWCT (配列番号 27)
- 25) DCTYRX⁵GNLVWCT (配列番号 28)
- 26) DCTYSX⁵GNLVWCT (配列番号 29)
- 27) DCTYTX⁵GNLVWCT (配列番号 30)
- 28) DCTYTX⁵GELVWCT (配列番号 31)
- 29) DCTYTX⁵GRLVWCT (配列番号 32)
- 30) DCTYTX⁵GDLVWCT (配列番号 33)
- 31) DCTYTX⁵GNLIWCT (配列番号 34)
- 32) DCAYHRGELVWCT (配列番号 35)
- 33) GPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号 36)
- 34) RCAYHRGELVWCS (配列番号 37)
- 35) GPRCAYHRGELVWC SFH (配列番号 38)
- 36) SPDCAYHRGELVWCTFH (配列番号 39)
- 37) GDDCAYHRGELVWCTFH (配列番号 40)
- 38) GPSCAYHRGELVWCTFH (配列番号 41)
- 39) GPDCAYHRGELVWC SFH (配列番号 42)
- 40) GPDCAYHRGELVWCTHH (配列番号 43)

- 4 1) GPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号44)
- 4 2) SPDCAYHRGELVWCTFY (配列番号45)
- 4 3) SDDCAYHRGELVWCTFY (配列番号46)
- 4 4) DCTYHRGNLVWCT (配列番号47)
- 4 5) DCAYHRGNLVWCT (配列番号48)
- 4 6) DCTYHRGELVWCT (配列番号49)
- 4 7) DCAWHRGELVWCT (配列番号50)
- 4 8) DCTYTNGNLVWCT (配列番号51)
- 4 9) DCAYTNGNLVWCT (配列番号52)
- 5 0) DCSYTNGNLVWCT (配列番号53)
- 5 1) DCTWTNGNLVWCT (配列番号54)
- 5 2) DCTYHNGNLVWCT (配列番号55)
- 5 3) DCTYRNGNLVWCT (配列番号56)
- 5 4) DCTYSNGNLVWCT (配列番号57)
- 5 5) DCTYTRGNLVWCT (配列番号58)
- 5 6) DCTYTNGELVWCT (配列番号59)
- 5 7) DCTYTNGRLVWCT (配列番号60)
- 5 8) DCTYTNGDLVWCT (配列番号61)
- 5 9) DCTYTNGNLIWCT (配列番号62)

[0113] 一例として、以下の構造を有するペプチドを担体結合として用いることができる。



[0114] 式(11)において、Linker2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(11)のN

末端アミノ酸の末端 ($-NH^2$) はアセチル化されて ($CH_3-C(=O)-NH-$) 基となってもよい。また、L i n k e r 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L i n k e r 中のN末端近傍の適切な位置にL y s 残基が導入される)、この場合、C末端のL i n k e r 2 は存在しても存在しなくてもよい。

[0115] 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。

[21] X^9 が、G F、A F、 β A l a F、 $NH_2-(PEG)_n-CO$ ($n=2\sim 10$)-F、F、K、O r n、C、及びD p r からなる群から選択される。

[22] X^9 が、G F、F、及びKからなる群から選択される。

[23] 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。

[24] X^{11} 及び X^{12} がRである。

[0116] 上記式 (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、以下のペプチドを挙げることができる：

60) F N M Q C Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I R D D C (配列番号63)、

61) G F N M Q C Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I R D D C (配列番号64)、

62) K N M Q C Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I R D D C (配列番号65)、

63) G F N M Q C Q K R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I R D D C (配列番号66)、

64) K N M Q C Q K R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I R D D C (配列番号67)、

又は

66) G K N M Q C Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I

RDDC（配列番号68）。

[0117] 例えば、以下の構造を有するペプチドを担体結合用ペプチドとして用いることができる。

Acetyl-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARI
RSIRDDC-SGSGSK-NH₂

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

[0118] 担体結合用のペプチドは、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、及びアルギニン残基の側鎖アミノ基であってもよい。

[0119] また、薬剤結合用ペプチドの場合、上述の（iii）又は（iv）のペプチドが好ましい。

[0120] 上記式（I'）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、上記式（I'）で表されるペプチドは、以下の式（I''）で表されるペプチドであってもよい。

$$[(X^{1_{1-3}}) - C - (X^2) - (X^3) - (X^4) - (X^5) - G - (X^6) - L - (X^7) - W - C - (X^{8_{1-3}}) - (Linker3)] - Z \cdots (I'')$$

[式（I''）において、Zは官能基を表し、[(X^{1₁₋₃}) - C - (X²) - (X³) - (X⁴) - (X⁵) - G - (X⁶) - L - (X⁷) - W - C - (X^{8₁₋₃}) - (Linker3)]であらわされる構造の任意の部分に結合し、(Linker3)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X¹、X²、X³及び各X⁸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、Tle、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。]

[0121] 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。

[0122] 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)-(X¹⁻³)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸⁻³)又は(X¹⁻³)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸⁻³)-(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。

[0123] 一例として、薬剤結合用ペプチドとしては、以下のペプチドを挙げることができる。

Acetyl-K(Z)-RRRGS-GPDCA YHKGEL VWCTF
H-NH₂

Acetyl-K(Z)-EEGGS-GPDCA YHKGEL VWCTF
H-NH₂

Acetyl-K(Z)-(PEG)₄-GPDCA YHKGEL VWCTF
H-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-NH

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

[0124] 式(11')において、Linker2は、SGSGSK、SRRCR、SRRK(Z)R、SRRCRRCRRC、SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)、若しくは(PEG)₁₋₈-Lys(好ましくは、(PEG)₄-Lys)であるか、又は存在しない。また、式(11')のN末端アミノ酸の末端(-NH₂)はアセチル化されて(CH₃-C(=O)-NH-)基となってもよい。また、リンカーに含まれるCys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。

[0125] 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。

[a] X⁹が、GF、AF、βAlaF、NH₂-(PEG)_n-CO(n=1~50)-F、F、K、Orn、C、Dpr、及びAcetyl-Kからなる群から選択される。

[b] X⁹が、GF、F、及びAcetyl-Kからなる群から選択される。

[b] X¹¹及びX¹²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。

[c] X¹¹が、Rである。

[d] X¹²が、R又はK(Z)である(好ましくは、Zがアジドである)。

[0126] 上記式(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、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)：

FNMQQQC RFYEALHDPNLNEEQRNARICSI RDDP
-SRRCRRCRRC-NH₂

Acetyl-KNMQQQC RFYEALHDPNLNEEQRNARICSI RDDP-SRRCRRCRRC-NH₂

GFNMQQQC RFYEALHDPNLNEEQRNARICSI RDDP-SRRCRRCRRC-NH₂

FNMQCQZ RFYEALHDPNLNEEQRNARISIRDDC

—NH₂

Acetyl—KNMQCQZR FYEALHDPNLNEEQRNARI

RSIRDDC—NH₂

GFNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARI RS I

RDDC—SRRK (Z) R—NH₂

FNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARI RS I R

DDC—NH₂

Acetyl—KNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRN

ARISIRDDC—SRRK (Z) R—NH₂

GFNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARI RS I

RDDC—SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) —NH₂

Acetyl—KNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRN

ARISIRDDC—SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) —NH₂

GFNMQCQK (Z) RFYEALHDPNLNEEQRNARI RS I

RDDC—SRRK (Z) RRK (Z) RRK (Z) —NH₂

[0127] その他、Fc結合性ペプチドとしては、以下のペプチドを挙げることができる(図4)。

1) CAWHLGELVWC (配列番号70)

2) DCAWHLGELVWCT (配列番号71)

3) DCAWHLGELVFCT (配列番号72)

4) DCAWHLGELVXCT (配列番号73)

X=1-naphtoyl、2-naphtoyl、benzyl、又は
benzothiophene

5) CDCAWHLGELVWCTC (配列番号74)

6) CAYHLGELVWC (配列番号75)

7) DCAYHLGELVWCTF (2-Pya) (配列番号76)

[0128] 例えば、本明細書の薬剤結合用ペプチドは、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、反応性官能基(好ましく

はアジド基)が結合していてもよい。例えば、ペプチドの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反応性官能基(例えばアジド基)を有する。アジド基を有するペプチドは、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ペプチドに連結することができる。また、ペプチド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。

[0129] 本明細書のペプチドは、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、上記反応性官能基を介して(例えば、アミノ末端などに)結合させることもできるし、ペプチド中のアミノ酸(例えば、リシン残基)が反応性官能基を有する場合には、当該反応性官能基(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、ペプチド中のCys残基(例えば、Linker 2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。

[0130] 本明細書のペプチド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。

[0131] 薬剤結合用ペプチドは、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、及びアルギニン残基の側鎖アミノ基であってもよい。

[0132] 上記架橋剤による架橋は、アルカリに対して耐性が強いことから、本実施

に形態に係る架橋方法は、2つ以上のSH基を有するタンパク質又はペプチド又はその融合物のアルカリ耐性を改善させる方法とすることができる。本実施に形態に係る架橋方法は、例えば、ジスルフィド結合のアルカリ耐性を改善させる方法、分子内にジスルフィド結合を有するタンパク質又はペプチドのアルカリ耐性を改善させる方法又は安定性を向上させる方法としてもよい。具体的には、タンパク質又はペプチドのアルカリ耐性を改善する方法であって、上記方法により前記タンパク質又はペプチド内の2つのチオール基を結合させることを含む方法が提供される。

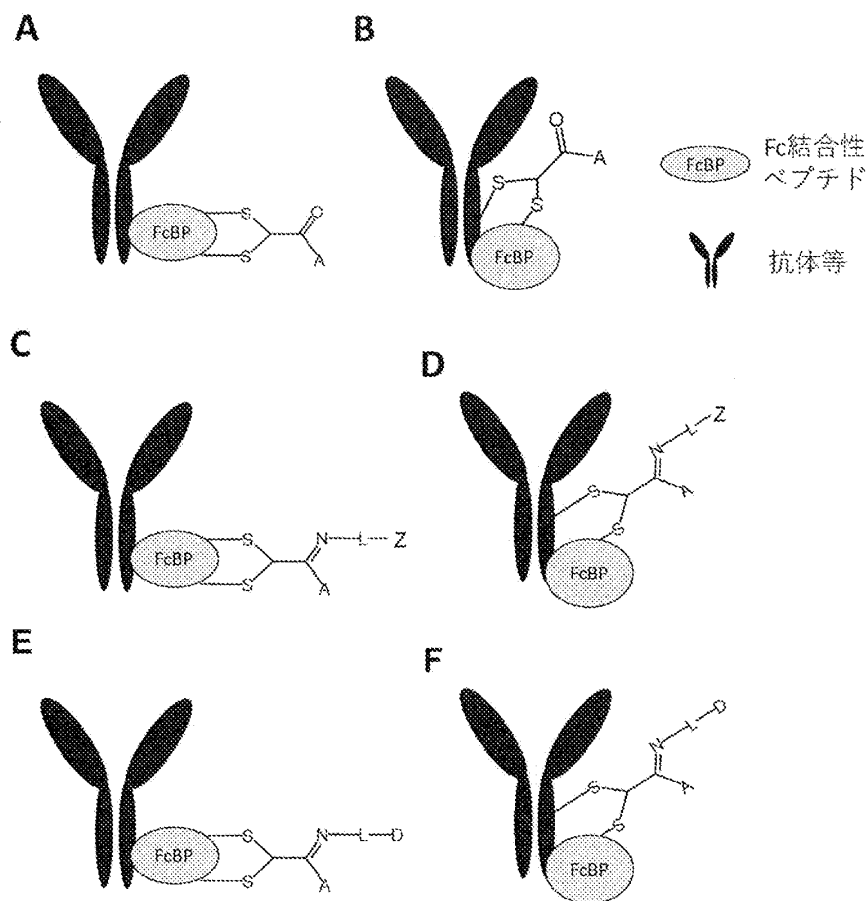
[0133] (架橋Fc結合性ペプチドが結合したIgGのFc領域を有する分子)

Fc結合性ペプチドは、IgGのFc領域を有する分子と結合することができる。よって、別の実施の形態に係る複合体は、上記架橋剤により分子内が架橋されたFc結合性ペプチドと、IgGのFc領域を有する分子との複合体である。当該複合体は、IgGのFc領域を有する分子に、薬剤を含む上記架橋剤で架橋されたFc結合性ペプチドが結合した複合体；並びに、IgGのFc領域を有する分子に、反応性官能基を含む上記架橋剤で架橋されたFc結合性ペプチドが結合した複合体を含む。

[0134] また、本実施の形態に係る架橋剤は、Fc結合性ペプチドとIgGのFc領域を有する分子との間を架橋してもよい。具体的には、上記Fc結合性ペプチドは、抗体等に含まれるシステイン残基のSH基と架橋剤を介して結合してもよい。このような抗体等-Fc結合性ペプチド架橋物におけるFc結合性ペプチドは更に分子内が架橋されていてもよく、例えば、分子内架橋により反応性官能基／薬剤がFc結合性ペプチドに結合し、当該Fc結合性ペプチドが抗体等のFc領域を有する分子とさらに架橋されていてもよい。よって、別の実施の形態に係る複合体は、上記架橋剤により架橋された、Fc結合性ペプチドと、IgGのFc領域を有する分子との複合体である。当該複合体は、IgGのFc領域を有する分子と、Fc結合性ペプチドとが、薬剤を含む上記架橋剤で架橋された複合体；並びに、IgGのFc領域を有する分子と、Fc結合性ペプチドとが、反応性官能基を含む前記架橋剤で架橋

された複合体を含む。

[0135] [化51]



[0136] 本明細書において、「IgGのFc領域を有する分子」は、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、リボソーム、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ⅤⅢⅢ因子、CTLA4、ヒトラク

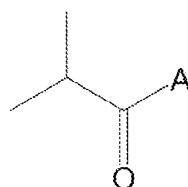
トフェリン、TNF受容体、若しくはLFA-3、あるいはその一部（好ましくは標的結合部分）などが挙げられる。

[0137] 上記複合体は、上述の架橋剤で架橋されたFc結合性ペプチドをIgGのFc領域を有する分子と接触させることにより製造することができる。よって、薬剤が融合したIgGのFc領域を有する分子の製造方法は、IgGのFc領域を有する分子と、上記架橋剤で架橋されたFc結合性ペプチドとを接触させることを含む。あるいは、当該複合体は、Fc結合性ペプチドをIgGのFc領域を有する分子に結合させた後に、上記架橋剤で分子内及び／又は分子間を架橋することにより製造することができる。

[0138] よって、IgGのFc領域を有する分子の製造方法は、架橋されたFc結合性ペプチドが結合した、IgGのFc領域を有する分子の製造方法であって、

IgGのFc領域を有する分子に結合したFc結合性ペプチドと、上記架橋剤とを反応させて、上記Fc結合性ペプチド中の2つのチオール基を以下の基

[化52]

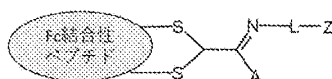


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基である]

を介して互いに結合させることを含む。

[0139] また、IgGのFc領域を有する分子の製造方法は、以下の式で表される反応性官能基Zが結合したFc結合性ペプチド

[化53]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基であり、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

が結合した、I g GのFc領域を有する分子の製造方法であって、

以下の式で表される架橋されたFc結合性ペプチド

[化54]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基である]

が結合した、I g GのFc領域を有する分子と、NH₂-L-Z（Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す）とを反応させることにより、上記架橋されたFc結合性ペプチドにおける架橋部分に反応性官能基を導入することを含む。

[0140] Fc結合性ペプチドを抗体等と結合させる方法は、国際公開第2013/027796号、国際公開第2018/092867号、国際公開第2020/075670号等を参照して行うことができる。

[0141] Fc結合性ペプチドにおける、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部分で修飾されていてもよく、該ペプチドが抗体等と結合した際には当該部分で抗体等と共有結合していてもよい。本明細書において、このような部分で修飾されたFc結合性ペプチドを「CCAP試薬」ということがある。本明細書において「抗体と共有結合するための部分」とは、Fc結合性ペプチドと、I g GのFc領域を有する分子とを、共有結合により連結させるための化学構造であり、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1箇所有する化合構造とすることができ、このような抗体と共有結合するための部分をもたらす化合物としては、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(アジピ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(スクシンイミジルプロピオン酸))を挙げることができ、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、Fc結合性ペプチドのN末端をブロッキングした上で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。Fc結合性ペプチドとIgGとの間の架橋は、例えば、Fc結合性ペプチドの上記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。

[0142] C CAP試薬であるFc結合性ペプチドと抗体等と結合は、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結合性ペプチドと抗体等とを、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結合性ペプチドと抗体等との混合比率は、例としてFc結合性ペプチド：抗体等のモル比率は、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、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。得られた結合物は、更に、必要に応じて、精製されていてもよい。

[0143] IgG等のFc領域は通常2本で対となる対称な重鎖定常領域を形成する

ため、Fc結合性ペプチドが結合する部位が2か所存在し得る。よって、Fc結合性ペプチドは、IgGのFc領域を有する分子1分子に1～2個結合することができ、好ましくは、1個である。

[0144] (架橋Fc結合性ペプチド結合担体)

また、Fc結合性ペプチドは、カラム等の担体に結合することにより、抗体等の精製に用いることができる。本発明の架橋法はアルカリに対する耐性が向上することから、本発明の架橋剤で架橋されたFc結合性ペプチドを用いることにより、1回又は複数回アルカリ洗浄して担体を再利用することが可能である。よって、一態様では、上記架橋剤により分子内架橋されたFc結合性ペプチドが結合した担体が提供される。担体へのペプチドの結合は、例えば、アミノ基と反応することができる官能基を有する担体に、ペプチドを反応させることにより行うことができる。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。

[0145] 担体としては、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、及び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（カラムクロマトグラフィー）である。担体としては、例えば、HiTrap NH₂-activated HP (GE Healthcare) などを用いることができる。

[0146] また、上記担体を利用したIgGのFc領域を有する分子の精製方法が提供される。一態様における抗体等の精製方法は、抗体等含有液を上記担体に接触させて抗体等を担体に結合させること、担体に結合しない成分を洗浄して除去すること、及び担体に結合した成分を溶出させて回収することを含む。

[0147] 抗体等含有液と、担体との接触は、両者が十分の接触可能な条件で行われ

る。例えば、担体がカラムの場合、抗体等含有液をカラムにインジェクトすることにより行われる。担体に結合しなかった成分を除去することは、常法により行うことができ、例えば、緩衝液（pH約7.0）にて抗体等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。担体に結合した抗体等の回収は、pH2.5以上で行うことができるが、抗体等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、例えば、pH3.6～pH4.3とすることができる。あるいは、担体としてビーズを用いる場合には、抗体等と担体を接触させた後、遠心分離等でビーズを回収して溶出液中に再懸濁させることにより抗体等を回収することができる。

[0148] （医療用組成物）

別の態様において、上記架橋剤により架橋されたペプチド及び／又はタンパク質、あるいは、本発明の架橋剤により架橋されたFc結合性ペプチドが結合したIgGのFc領域を有する分子を有効成分として含有する医療用組成物、特に、治療薬、予防薬、又は診断薬が提供される。治療又は予防効果のある薬剤が結合した架橋剤により架橋されたペプチド又はタンパク質は医療用（治療用又は予防用）組成物として用いることができる。

[0149] 上述において、ペプチド及び／若しくはタンパク質、又は架橋剤を介して結合した薬剤Dが治療薬、予防薬、又はワクチンとしての機能を持つ薬剤である場合、前記架橋されたペプチド及び／若しくはタンパク質、又はそれが結合した抗体等は、治療用又は予防用として用いることができる。

[0150] 上述において、ペプチド及び／若しくはタンパク質、又は架橋剤を介して結合した薬剤Dが標識としての機能を持つ薬剤である場合、前記架橋されたペプチド及び／若しくはタンパク質、又はそれが結合した抗体等は、診断用又は検出用として用いることができる。

[0151] 上述の組成物が治療用又は予防用組成物である場合、上記薬剤は治療剤又は予防剤であり、診断薬である場合、前記薬剤は標識物質である。医療用組成物の対象疾患は、使用するペプチド、タンパク質、又は抗体等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、がん、炎症性疾

患、感染症、及び神経変性疾患が挙げられる。

[0152] 例えば、医療用組成物は、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、有効成分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、バイアル又はシリンジに充填される。また、有効成分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、シロップ剤及び顆粒剤等を挙げることができる。

[0153] 医療用組成物は、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の有効成分又は薬剤を含有していても良い。

[0154] 医療用組成物の投与ルートは、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。医療用組成物の投与レジメンは、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0.1～10

mg/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。他の非経口投与及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。

[0155] 以下に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。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。

[0156] (実施例1) 1, 1-ジクロロアセトン架橋環状ペプチドの調製

原料ペプチド〔配列：Fmoc-HN-GSGGS-GPDCA YHRGELVWCTFH（配列番号1）：lgGBP-longGS又はlgGBP-LGS〕は、固相ペプチド合成法（Fmoc法）にて委託合成した（Eurofins社）。上記の原料ペプチド5mg（1.95μmol）を1500μLのDMFに溶解し、これに予めPBS（pH7.4）2mLで溶解したTCEP・HCl（1.12mg、3.9μmol、2等量モル）を加えて室温で30分間攪拌しながら還元反応した。その後、アセトニトリル120μLに溶解した1, 1-Dichloro-2-propanone（0.495mg、3.9μmol、2等量モル）を加えて、室温で攪拌した。1時間後、LC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液をHPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、Fmoc環化ペプチド（2mg、0.76μmol、収率40%）を得た。その後、Fmoc保護基を脱保護するために、2%ピペリジンを追加し、10分後にLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液を直接HPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、環化ペプチド（1mg、0.38μmol、収率20%）を得た。最終精製ペプチドはLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）により分子量を確認し、凍結乾燥した。

[0157] (実施例2) 1, 1-ジクロロピナコリン架橋環状ペプチドの調製

原料ペプチド〔配列：Fmoc-HN-GSGGS-GPDCA YHRG

ELVWCTFH（配列番号1）]は、固相ペプチド合成法（Fmoc法）にて委託合成した（Eurofins社）。上記の原料ペプチド10mg（ $3.9\mu\text{mol}$ ）を1500 μL のDMFに溶解し、これに予めPBS（pH7.4）2mlで溶解したTCEP $\cdot\text{HCl}$ （2.24mg、 $7.8\mu\text{mol}$ 、2等量モル）を加えて室温で30分間攪拌しながら還元反応した。その後、アセトニトリル120 μL に溶解した1,1-ジクロロピナコリン（1.32mg、 $7.8\mu\text{mol}$ 、2等量モル）を加えて、室温で攪拌した。1時間後、LC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液をHPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、Fmoc環化ペプチド（7mg、 $2.7\mu\text{mol}$ ）を得た。その後、Fmoc保護基を脱保護するために、2%ピペリジンを添加し、10分後にLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液を直接HPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、環化ペプチド（5mg、 $2.04\mu\text{mol}$ 、収率50%）を得た。最終精製ペプチドはLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）により分子量を確認し、凍結乾燥した。

[0158]（実施例3）2,2-ジクロロアセトフェノン架橋環状ペプチドの調製

原料ペプチド[配列：Fmoc-HN-GSGGS-GPDCA YHRGELVWCTFH（配列番号1）]は、固相ペプチド合成法（Fmoc法）にて委託合成した（Eurofins社）。上記の原料ペプチド2.5mg（ $1.00\mu\text{mol}$ ）を1500 μL のDMFに溶解し、これに予めPBS（pH7.4）2mlで溶解したTCEP $\cdot\text{HCl}$ （0.506mg、 $2.0\mu\text{mol}$ 、2等量モル）を加えて室温で30分間攪拌しながら還元反応した。その後、アセトニトリル120 μL に溶解した2,2-ジクロロアセトフェノン（0.38mg、 $2.0\mu\text{mol}$ 、2等量モル）を加えて、室温で攪拌した。1時間後、LC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液をHPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、約2mgのFmoc環化ペプチドを得た。その後、

Fmoc保護基を脱保護するために、2%ピペリジンを添加し、10分後にLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液を直接HPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、環化ペプチド（1.2mg、0.49 μ mol、収率49%）を得た。最終精製ペプチドはLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）により分子量を確認し、凍結乾燥した。

[0159]（実施例4）架橋環状ペプチドの結合親和性の測定

親和性解析は、以下の方法で行った。まず、BLAcoreT200（GE healthcare）にセットしたCM5センサーチップ上へ、等量混合した0.4M 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）と0.1M スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド（sulfo-NHS）溶液を10 μ l/mlの流速でセンサーチップにインジェクトすることにより、センサーチップを活性化した。その後、pH5.5（10mM 酢酸Na）の条件下で、IgGをセンサーチップ上に固定化した。測定には、HBS-EP緩衝液（10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Tween20、3mM EDTA、pH7.4）を用い、流速50 μ l/mlにて、15.625、31.2、62.5、125、250、500nMのペプチドを180秒間インジェクトすることで結合反応をモニターした。解離反応測定の際は、緩衝液のみを600秒間インジェクトした。相互作用パラメータの解析は、BLAevaluation T100ソフトウェアを用いて行った。

[0160] 比較評価したIgG結合ペプチド誘導体を図1に示す。これらのペプチドのヒトIgG1との親和性を評価した結果を、表1に示した。ジスルフィド結合を有するオリジナルIgG結合ペプチドの親和性は、Kd値で8.2nMであるが、1,3-ジクロロアセトン架橋環状ペプチドでは4.9 μ Mと約500倍、親和性が低下した。一方で、1,1-ジクロロアセトン架橋環状ペプチドでは、Kd値は45.6nMと元のペプチドの約5倍の低下、1,1-ジクロロピナコリン架橋環状ペプチドでは、Kd値は112nMと元

のペプチドの約1.4倍の低下、2, 2-ジクロロアセトフェノン架橋環状ペプチドでは、 K_d 値は6.4 nMと元のペプチドと同程度であった。

[0161] [表1]

ペプチド名	ペプチド配列	架橋剤名	SPR		
			k_a	k_d	K_d 値 (nM)
IgG-BP-LongGS	GSGGSGPDCAVHRGELVWCTFH	Original	2.37E+06	0.019	8.0
		1,1-dichloroacetone	1.84E+06	0.0604	45.6
		1,1-dichloroacetophenone	5.64E+06	0.03625	6.4
		1,1-dichloropinacolin	3.33E+06	0.0677	112.0
		1,3-dichloroacetone	1.00E+03	0.005	4900

[0162] (実施例5) ペプチド固定化カラムの調製及びIgGの精製

1 mL容量のNHS活性化プレパックカラムに、1 mM塩酸5 mLを送液し、カラム内のイソプロパノール溶液を除去した。次いで、10.0 mg/mLペプチド溶液(DMSO 100 μ Lに溶解)をカップリング溶液(20 mM 炭酸緩衝液、50 mM 塩化ナトリウム、pH 8.3)で10倍に希釈し、希釈液1 mLを送液して、室温で4時間固定化した。その後、1 M Tris (pH 8.0) 5 mLで、未反応のNHSを室温で1時間ブロッキングした。その後、0.1 N NaOH水溶液5 mLで洗浄した。最後に、PBS溶液(20 mM リン酸緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4) 10 mLを送液し、クロマトグラフィー評価に用いた。

[0163] 作製したIgG結合ペプチド固定化カラムをBioLogic LP (Bio-Rad社製)液体クロマトグラフィーシステムに接続し、PBSで平衡化した。次いで、PBSに溶解した1 mg/mL ヒト血清由来IgG (Sigma-Aldrich社製)を1 mL/minの流速で1 min送液した。さらに、カラムをPBSで洗浄し、溶出溶液(100 mM グリシン緩衝液、pH 2.8)を送液することで、吸着成分であるIgGを溶出した。カラムからのIgGの溶出は、280 nmの吸光度で検出した。

[0164] (実施例6) ペプチド固定化カラムの動的結合容量(DBC)測定及びアルカリ耐性の評価1

上記と同様の方法で、ペプチド固定化量1 mgのカラムを作製した。作製

したカラムをPBSで平衡化した後、PBSに溶解した1mg/mL ヒト血清由来IgG (Sigma-Aldrich社製)を1mL/min (滞留時間1min)の流速で送液した。DBCは、添加したサンプルの280nm吸光度の10%の漏出が見られた時点の添加タンパク質量から求めたものを示している。

[0165] 次に、この1mgペプチド固定化1mLカラムに、0.1N水酸化ナトリウム水溶液を5mL送液した。その後、PBSで洗浄を行った。このサイクルを1, 1-ジクロロアセトン架橋環状ペプチドについては30回、1, 1-ジクロロピナコリン架橋環状ペプチドについては10回繰り返した。このサイクルの1~5回目、10回目、及び、1, 1-ジクロロアセトン架橋環状ペプチドについては更に20回目及び30回目に流速1mL/minでのDBC測定を行うことによりアルカリ耐性を評価した。また、その結果に基づいて、表2に従いカラム作製直後のDBCを100%としてDBC変動率を求めた。

[0166]

[表2]

0.1NNaOH 洗浄回数	IgG-BP-LGS/2,2-dichloroacetone (IgGBPLGS-DCA)			
	最大結合容量 (mg)	IgGBPLGS-DCA 最大結合容量変動率 (%)	動的結合容量 (mg/ml)	IgGBPLGS-DCA 動的結合容量変動率 (%)
1	9.68	100.0	12.78	100.0
2	9.70	100.2	12.78	100.0
3	9.88	102.1	12.18	95.3
4	10.12	104.5	12.18	95.3
5	9.93	102.6	12.38	96.9
10	9.32	96.3	12.18	95.3
20	8.35	86.3	12.38	96.9
30	8.78	90.7	11.58	90.6

0.1NNaOH 洗浄回数	IgG-BP-LGS/1,1-dichloropinacolin (IgGBPLGS-DCP)			
	最大結合容量 (mg)	IgGBPLGS-DCP 最大結合容量変動率 (%)	動的結合容量 (mg/ml)	IgGBPLGS-DCP 動的結合容量変動率 (%)
1	12.11	100.0	16.70	100.0
2	12.09	99.8	17.20	103.0
3				
4				
5	10.87	89.8	16.24	97.2
10	10.55	87.1	14.46	86.6
20				
30				

0.1NNaOH 洗浄回数	IgG-BP-LGS			
	最大結合容量 (mg)	IgGBPLGS 最大結合容量変動率 (%)	動的結合容量 (mg/ml)	IgGBPLGS 動的結合容量変動率 (%)
1	12.37	100.0	17.24	100.0
2				
3				
4				
5	6.09	49.2	8.74	50.7
10				
20				
30				

[0167] 一方、それぞれのペプチドカラムの初期DBC値は、オリジナルペプチドでは17.24mg/mL-column、1,3-ジクロロアセトン架橋ペプチドでは2.3mg/mL-columnである一方、今回の1,1-

ジクロロアセトン架橋ペプチドでは12.8 mg/mL-column、1, 1-ジクロロピナコリン架橋ペプチドでは16.70 mg/mL-columnであった。よって、従来の架橋環状ペプチドに比べてIgG吸着性能が高いことが明らかとなった。

[0168] (実施例7) ペプチド固定化カラムの動的結合容量(DBC)測定及びアルカリ耐性の評価2

作製した1 mg ペプチド固定化1 mL カラムに、0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を5 mL 送液し、その後、5 mL PBSで洗浄を行った。これを1 サイクルとし、1~30回NaOH水溶液洗浄/PBS洗浄処理を行った後に、指定回数(1、2、3、4、5、10、20、30回目)において流速1 mL/minでDBC測定を行った。

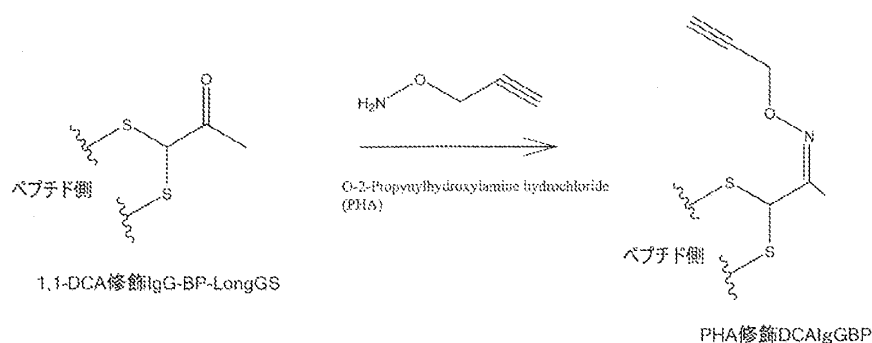
[0169] 結果を図2に示す。ジスルフィド結合を含むオリジナルIgG結合ペプチドでは、アルカリ洗浄によって抗体のカラムへの結合量が低下した(非図示)が、1, 1-ジクロロアセトン架橋ペプチド及び、1, 1-ジクロロピナコリン架橋ペプチドでは、抗体のカラムへの結合量の低下は極め微小であることが分かった。

[0170] この抗体結合量の変化の速度を、DBC10%の値で、比較した結果を図3に示す。元のジスルフィド結合を有するIgG結合ペプチド固定化カラムでは、5回のアルカリ洗浄によってDBCは50%以下まで低下したが、1, 1-ジクロロアセトン架橋ペプチドでは、30回洗浄で90%以上を、1, 1-ジクロロピナコリン架橋ペプチドでは、10回洗浄で85%以上を維持していた(図3)。このことにより1, 1-ジクロロアセトン架橋ペプチド及び1, 1-ジクロロピナコリン架橋ペプチドは、明らかに高いアルカリ耐性を獲得していることが分かった。一方、DBCの値そのものでは、オリジナルのジスルフィド結合を有するIgG結合ペプチド固定化カラムが、17.24 mg/mLであるのに対し、1, 1-ジクロロアセトン架橋ペプチドカラムでは12.8 mg/mLと74%程度、1, 1-ジクロロピナコリン架橋ペプチドカラムでは16.70 mg/mLと96%程度であったが、

一般にDBCは、固定化するリガンド（ペプチド）量、流速によっても大きく変化することから、今回の1, 1-ジクロロアセトン架橋ペプチド及び1, 1-ジクロロピナコリン架橋ペプチドを使ったカラムでも最適条件を見出すことで、実用に適したカラムに仕上げる事が可能であると思われる。

[0171] （実施例8）反応性官能基の導入

[0172] [化55]



[0173] 調製した1, 1-ジクロロアセトン架橋環状ペプチド0. 201 μmol を400 μl のDMFで溶解し、それに予め1. 0mlの0. 2M NaHCO₃緩衝液（pH8. 3）で溶解した100倍容量のO-2-Propynylhydroxylamine 塩酸塩（20. 1 μmol ）溶液を添加した。その反応液を室温で24時間攪拌した。LC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）によって反応の終了を確認し、反応溶液を直接HPLC（C18逆相カラム）にて精製することによって、アルキン官能基導入架橋環化ペプチド（0. 10 μmol 、収率50%）を得た。最終精製ペプチドはLC-MS分析（島津社製、LC-MS8030）により分子量を確認し、凍結乾燥した。得られた化合物を実施例4（架橋環状ペプチドの結合親和性の測定）と同様に親和性を測定した結果、K_d値は334 nMと元のペプチドの約42倍の低下が見られた。

[0174] （実施例9）1, 1-ジクロロアセトンによるVHH抗体の架橋

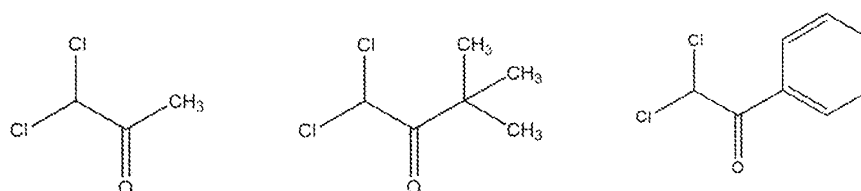
950 $\mu\text{g/ml}$ のanti-CD89VHH抗体（IgARC25）100 μl （95 μg 、 $5.6 \times 10^{-10}\text{mol}$ ）PBS溶液（pH7. 4）に、最

終濃度 5 M になるように尿素溶液を加え室温で 1 時間放置した。その後、TCEPCEP・HCl (11.2 nmol、2 等量モル) を加えて室温で 30 分間攪拌しながら還元反応した。その後、アセトニトリル 120 μ L に溶解した 1,1-Dichloroacetone (11DCA、11.2 nmol、2 等量モル) を加えて室温で攪拌した。1 時間後、LC-MS 分析 (Waters 社製、Bio-Accord SYSTEM) によって反応の終了を確認した。その結果、架橋前の IgARC25 の分子量は 14,028 Da であったが、11DCA 処理後は 14,085 Da と 57 Da の増加したことにより 11DCA により架橋したことを確認した。

[0175] (実施例 10) ペプチド合成による架橋構造を持つペプチドの作製

以下の式で表される 1,1-ジクロロアセトン誘導体化合物 (1,1-ジクロロアセトン、1,1-ジクロロピナコリン、2,2-ジクロロアセトフェノン)

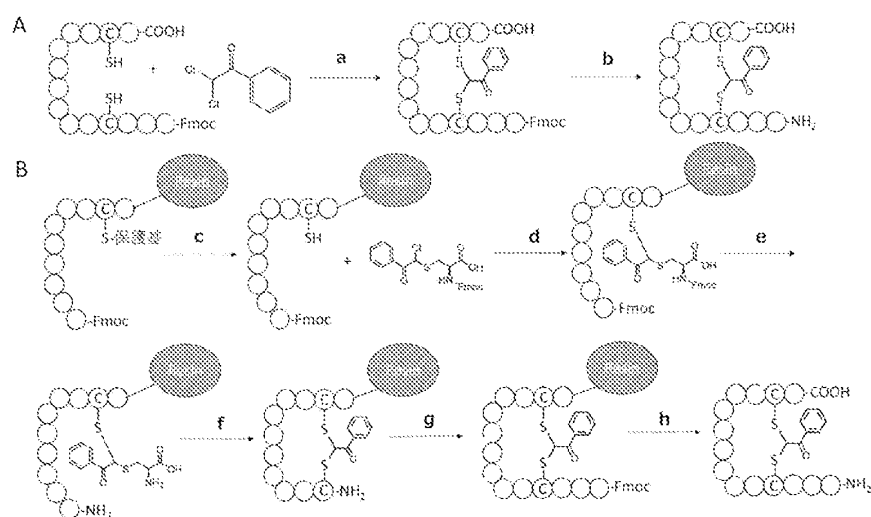
[化56]



によるジスルフィド結合の架橋反応では、以下の式に示したように、N末端を Fmoc で修飾した 2 つの Cys を有するペプチド (もしくは N末端を Fmoc で修飾したジスルフィド結合を有するペプチドを還元して得られるペプチド) と、1.0-2.0 等量の 1,1-ジクロロアセトン誘導体化合物とを PBS 中で反応させることにより架橋を行い (スキーム A の工程 a)、最後に N末端の Fmoc を外し、脱保護することで (スキーム A の工程 b) 調製している。一方で、この方法によらない、スキーム B に示したような、Fmoc 法でのペプチド合成中に架橋反応を行う方法を考案した。ペプチド合成樹脂 (レジン) 上で Fmoc 法にて、C末端から、架橋をする 2 つ Cys の片方を含むペプチドを残りの Cys の手前まで 1 つ手前まで合成する。

ペプチド中のCysの保護基を脱保護後（スキームBの工程c）、Fmoc化クロロアセトフェノイルシステインを添加し連結させる（スキームBの工程d）。Fmocを脱保護し（スキームBの工程e）、生じたペプチドのN末端 α アミノ基とアセトフェノイルシステイン側の α カルボキシル基をカップリングさせる（スキームBの工程f）。残りのアミノ酸をFmoc法にて連結合成し（スキームBの工程g）、最後に、樹脂からの切断とFmocの脱保護により、目的のペプチドを得る。

[0176] [化57]

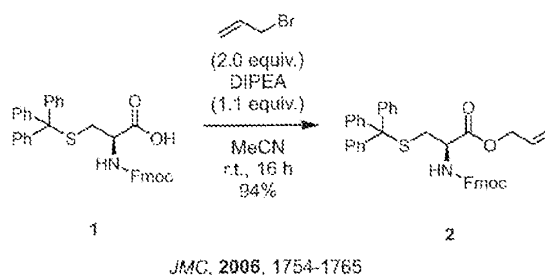


[0177] (Fmoc化アリル化クロロアセトフェノイルシステインの合成)

本方法に使用するFmoc化クロロアセトフェノイルシステイン（以下、化合物5）を以下の方法により合成した。ただし、以下では、Fmoc化クロロアセトフェノイルシステインの α カルボキシル基は、アリル基で保護されている。

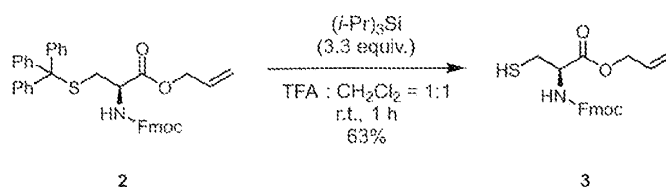
[0178]

[化58]



[0179] アルゴン気流下、化合物1（5.00 g、8.53 mmol）とアリルブロミド（1.44 mL、17.1 mmol、2当量）のアセトニトリル溶液（85 mL）に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.60 mL、9.38 mmol、1.1当量）を加え、室温で16時間攪拌した。水を加えて反応を停止した後、反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、2規程塩酸水溶液及び飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。これを濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝4：1）を用いて精製し、化合物2（5.03 g、94%）を得た。

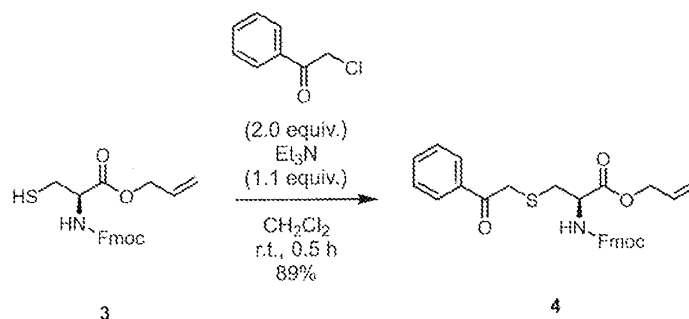
[0180] [化59]



[0181] トリフルオロ酢酸：ジクロロメタン＝1：1溶液（30 mL）に化合物2（5.03 g、8.03 mmol）とトリイソプロピルシラン（5.45 mL、26.5 mmol、3.3当量）を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、トルエンを用いて共沸後、濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝4：1）を用いて精製し、化合物3（1.94 g、63%）を得た。

[0182]

[化60]



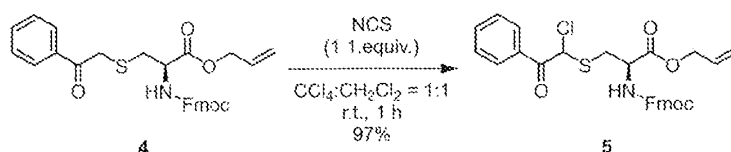
[0183] アルゴン気流下、化合物3（1.00g、2.63mmol）とフェナシクロライド（814mg、5.27mmol、2当量）のジクロロメタン溶液（26mL）に、トリエチルアミン（0.401mL、2.90mmol、1.1当量）を加え、室温で30分間撹拌した。水を加えて反応を停止した後、ジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。これを濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝2：1）を用いて精製し、化合物4（1.17g、89%）を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 7.96 (d, $J=7.8\text{ Hz}$, 2H), 7.76 (d, $J=7.3\text{ Hz}$, 2H), 7.64–7.57 (m, 3H), 7.47 (dd, $J=7.6, 8.0\text{ Hz}$, 2H), 7.40 (dd, $J=7.3, 7.8\text{ Hz}$, 2H), 7.31 (ddd, $J=1.4, 7.3, 7.3\text{ Hz}$, 2H), 5.94–5.84 (m, 2H), 5.33 (d, $J=16.9\text{ Hz}$, 1H), 5.24 (dd, $J=1.4, 10.1\text{ Hz}$, 1H), 4.71–4.64 (m, 3H), 4.40–4.38 (m, 2H), 4.23 (dd, $J=6.9, 6.9\text{ Hz}$, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.16–3.03 (m, 2H)

HRMS (FAB–TOF) m/z : $[(M+H)^+]$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_1\text{O}_5\text{S}_1$ 502.1688; found 502.1690.

[0184]

[化61]



[0185] アルゴン気流下、化合物4（204 mg、0.401 mmol）とN-クロロスクシンイミド（59.6 mg、0.447 mmol、1.1当量）の四塩化炭素：ジクロロメタン＝1：1溶液（4 mL）を加え、室温において1時間攪拌した。水を加えて反応を停止した後、水層をジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。これを濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタンのみ）を用いて精製し、化合物5（210 mg、97%）を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 7.99 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.63–7.57 (m, 3H), 7.48 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 2H), 7.39 (dd, $J = 7.3, 7.8$ Hz, 2H), 7.30 (ddd, $J = 1.0, 7.3, 7.3$ Hz, 2H), 6.37 (d, $J = 25.6$ Hz, 1H), 5.95–5.84 (m, 1H), 5.63–5.58 (m, 1H), 5.38–5.24 (m, 2H), 4.76–4.60 (m, 3H), 4.39 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.21 (dd, $J = 6.9, 6.9$ Hz, 1H), 3.51–3.14 (m, 2H)

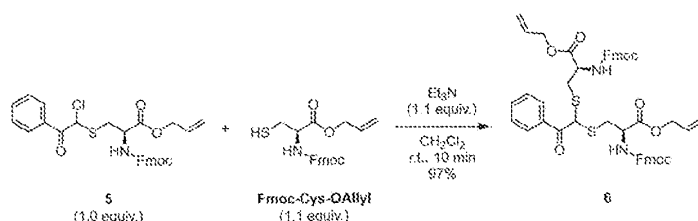
HRMS (FAB–TOF) m/z : $[(M+H)^+]$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_1\text{O}_5\text{S}_2\text{Cl}_1\text{S}_1$ 536.1296; found 536.1298.

[0186] (Fmoc化アリル化クロロアセトフェノイルシステインとCysとの反応性)

合成したFmoc化アリル化クロロアセトフェノイルシステイン（化合物5）が、Cysのチオールとの反応性を有するかどうか以下の反応で検証し

た。

[0187] [化62]



[0188] アルゴン気流下、化合物5 (59.0 mg、0.110 mmol) と Fmoc-Cys-OAllyl (0.046 mg、0.121 mmol、1.1 当量) のジクロロメタン溶液 (1.1 mL) に、トリエチルアミン (0.017 mL、0.121 mmol、1.1 当量) を加え、室温において10 分間撹拌した。水を加えて反応を停止した後、水層をジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。これを濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=3：1) を用いて精製し、化合物6 (93.8 mg、97%) を得た。

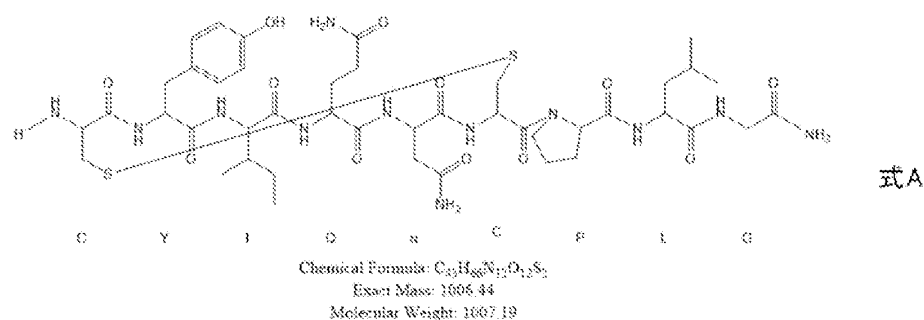
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) : δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.75 (dd, J = 2.7, 7.8 Hz, 4H), 7.59–7.53 (m, 5H), 7.41 (dd, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 7.39–7.35 (m, 4H), 7.30–7.26 (m, 4H), 5.91–5.80 (m, 2H), 5.70 (dd, J = 7.8, 22.0 Hz, 2H), 5.61 (s, 1H), 5.31 (d, J = 17.4 Hz, 2H), 5.22 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 4.69–4.59 (m, 6H), 4.41–4.29 (m, 4H), 4.19 (dd, J = 7.3, 7.3 Hz, 2H), 3.33–2.97 (m, 4H),
 HRMS (FAB-TOF) m/z : [(M+Na)⁺] calcd for C₅₀H₄₆N₂O₉S₂Na 905.2542; found 905.2542.

[0189] 以上の結果は、Fmoc化アリル化クロロアセトフェノイルシステイン（化合物5）が、Cysのチオールとの反応性を有していることを示しており、上記スキームBの工程dで示した反応が進行することが証明された。以上の結果から、上記Bのスキームでの新規架橋ペプチドの合成が実施できることが検証された。

[0190] （実施例11）オキシトシンの架橋

1. 1-ジクロロアセトンを用いて、オキシトシン（Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂（配列番号77）、分子内SS結合、分子量：1007.19）の架橋を行った。下記式Aに示すオキシトシンSS酸化型（オキシトシン-OX）の酢酸塩（Toronto Research Chemicals社製）10mg（9.92μmol）を、3mLの0.1M HEPES-HCl緩衝液（pH8.0）に溶解し、還元剤としてTCEP塩酸塩（Tris（2-carboxyethyl）phosphine Hydrochloride）57.1mg（200μmol）を溶解した10.2mLの0.1M HEPES-HCl緩衝液（pH8.0）を混合して、1時間攪拌した。これに、アセトニトリル0.722mLに溶解した1, 1-ジクロロアセトン2.77mg（21.8μmol）（オキシトシンに対するモル比2.2倍）を加え、1時間攪拌した。

[0191] [化63]

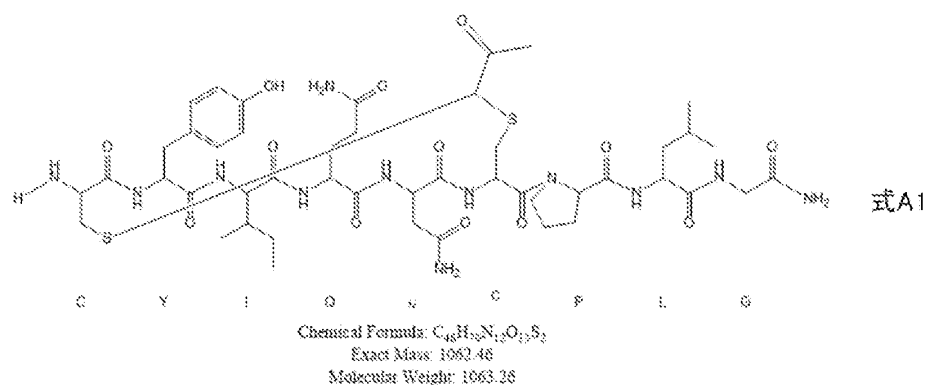


[0192] 得られた反応物をLC-MSにより次のように分析した。反応物を0.1%ギ酸で5倍に希釈後、20μLを、Peptide BEH-C18カラム

(130 Å、1.7 μm、2.1×100mm、Waters社製)を連結したAcquity UPLC/SQ detector system (Waters社製)にて分析した(流速:0.2 mL/分、溶出:0.1%ギ酸を含む4%CH₃CNから70%CH₃CNまでのリニアグラジエント、カラム温度:25℃)。

[0193] TCEP塩酸塩添加前のオキシトシン-OX及び反応物のLC-MSによる分析結果をそれぞれ図5A及び図5Bに示す。オキシトシン-OXのピークの質量の測定値は、1006.3であり、オキシトシン-OXの理論値である1007.19とほぼ一致した。一方、1.1-ジクロロアセトン架橋反応の反応物でのピークは、元のピークより遅れて溶出され、質量1060.4のピークであった。この質量は式A1に示すオキシトシンジクロロアセトン架橋型(オキシトシン-D A)の理論値:1063.26とほぼ一致したことから、目的の構造の架橋体が得られたと判断した。

[0194] [化64]

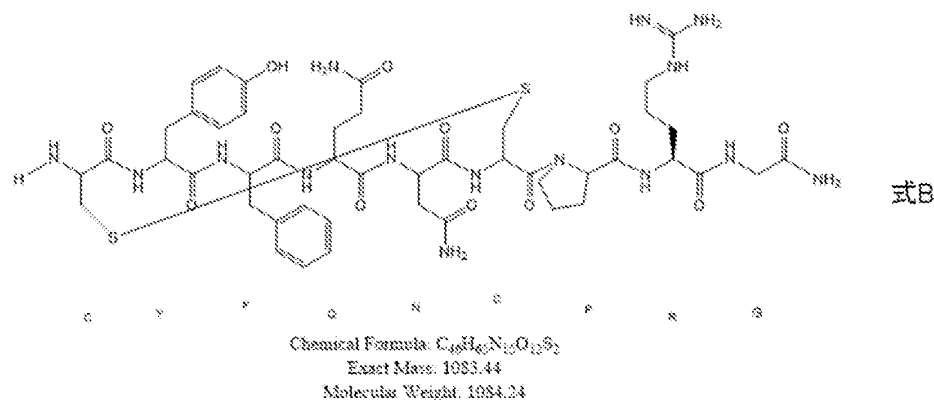


[0195] (実施例12) バゾプレッシンの架橋

1.1-ジクロロアセトンを用いて、バゾプレッシン(Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂(配列番号78)、分子内SS結合、分子量:1084.24)の架橋を行った。下記式Bに示すバゾプレッシンSS酸化型(バゾプレッシン-OX)酢酸塩(東京化成工業社製)5.5mg(5.07 μmol)を、1.65 mLの0.1M リン酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、TCEP塩酸塩24.6m

g (86.0 μmol) を溶解した4.4 mLの0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 8.0) を混合し、1時間攪拌した。これに、アセトニトリル0.371 mLに溶解した1,1-ジクロロアセトン1.42 mg (11.2 μmol) (バゾプレッシンに対するモル比2.2倍) を加え、1時間攪拌した。

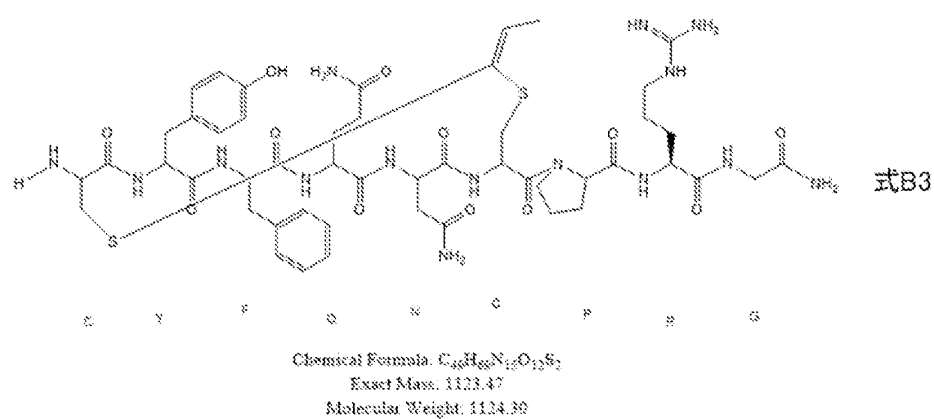
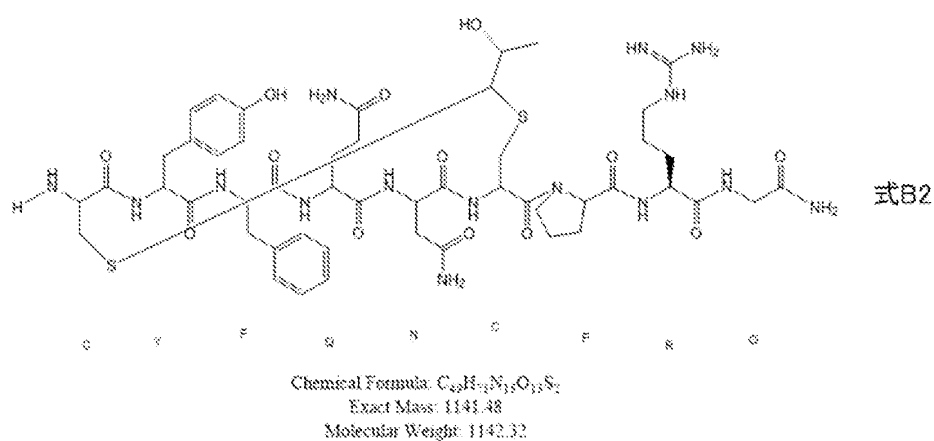
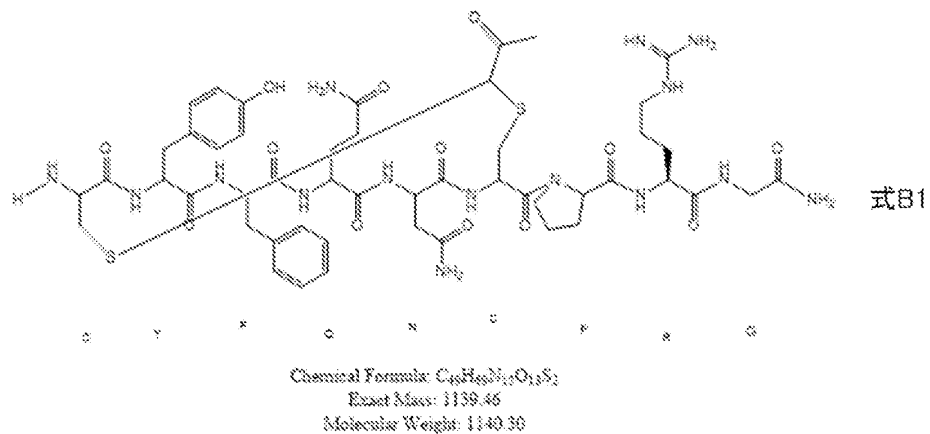
[0196] [化65]



[0197] 得られた反応物を試験例11と同様にLC-MSにより分析した。TCEP塩酸塩添加前のバゾプレッシン-OX及び反応物のLC-MSによる分析結果をそれぞれ図6A及び図6Bに示す。バゾプレッシン-OXのピークの質量の測定値は、1083.7であり、バゾプレッシン-OXの理論値：1084.24とほぼ一致した。一方、1,1-ジクロロアセトン架橋反応の反応物でのピークは、元のピークより遅れて溶出され、質量1139.0と質量1121.6のピークであった。1139.0の質量は下記式B1に示すバゾプレッシンジクロロアセトン架橋型（バゾプレッシン-D A）の理論値：1140.30とほぼ一致したことから、目的の構造の架橋体が含まれていると判断した。一方、1121.6の質量は、1139.0より17.4小さく、これは、式B1に示すバゾプレッシン-D Aが、TCEPによる還元反応を受け、下記式B2に示すバゾプレッシンジクロロアセトン架橋型の還元体（バゾプレッシン-D A-R）となり、さらに脱水反応を受けて、式B3に示すバゾプレッシンジクロロアセトン架橋型の還元・脱水体（バゾプレッシン-D A-RDH、質量理論値：1124.3）となったことが推

定された。

[0198] [化66]

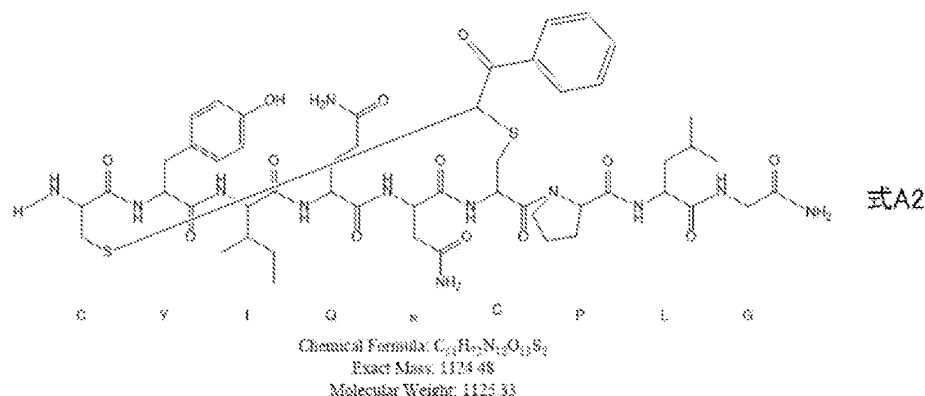


[0199] (実施例 13) オキシトシンの架橋によるプロテアーゼに対する耐性の獲得

架橋反応によるペプチドの安定化評価のため、2, 2-ジクロロアセトフェノンで架橋したオキシトシンを用いて、 α -キモトリプシン（ウシ膵臓由来、MP Biomedicals社製）によるプロテアーゼ分解に対する抵抗性を評価した。オキシトシンの2, 2-ジクロロアセトフェノンによる架橋は、実施例11における1, 1-ジクロロアセトンで2, 2-ジクロロアセトフェノンに置き換えて同様に行い、逆相HPLCにて目的物を分取した。詳細には、オキシトシン酢酸塩10mg（10 μ mol）を0.1M HEPES塩酸緩衝液（pH8.0）3mLに溶解し、TCEP $\cdot$ HCl57.4mg（200 μ mol）を含む0.1M HEPES塩酸緩衝液（pH8.0）2mLと混合し、1時間攪拌した。次に、0.44mLのアセトニトリルに溶解した2, 2-ジクロロアセトフェノン8.3mg（44 μ mol）を加えて混合し、1時間室温で攪拌した。得られたサンプルを、LC-Forte（YMC社製）に接続したInertSustain C18カラム（5 μ m、14 $\times$ 250mm、GLサイエンス社製）にアプライした（流速5mL/分）。溶出は、0.1%ギ酸を含む4%から70%のリニアグラジエントで行った。目的物を分取後、アセトニトリルを陰圧にて除去後、凍結乾燥した。

[0200] オキシトシンの2, 2-ジクロロアセトフェノン架橋型（オキシトシン-DP）の構造を式A2に示す。

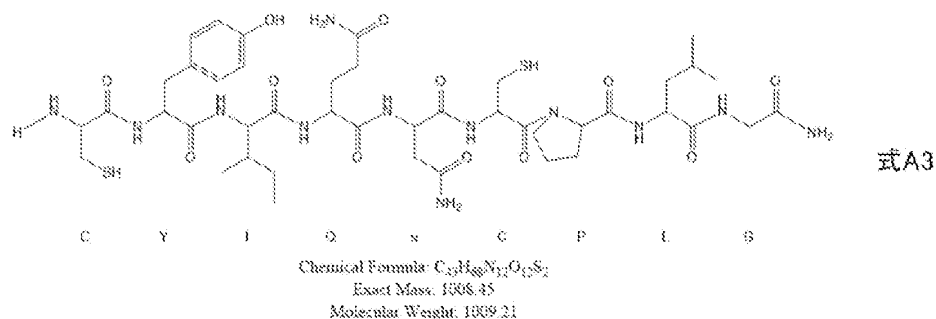
[0201] [化67]



[0202] 比較対象として、オキシトシン-OX及び下記式A3に示すオキシトシンSH還元型（オキシトシン-RD）を用いて評価した。すなわち、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に0.5mg/mLで溶解したオキシトシン溶液をオキシトシン-OXとし、0.5mg/mL TCEPを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に、0.5mg/mLで溶解したオキシトシン溶液を添加し、30分経過後に得られる物質をオキシトシン-RDとした。これらの溶液200μLに、1mg/mLのα-キモトリプシン10μL（オキシトシンに対する重量比で1/10）を加え、37℃でインキュベートし、逆相HPLCにて分析した。ブランクの場合、α-キモトリプシンの代わりにリン酸緩衝液を添加した。

[0203] また、0.5mg/mL TCEPを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に、精製したオキシトシン-DPを0.5mg/mLで溶解し、30分経過後に得られる物質をサンプルとし、同様にα-キモトリプシンを加え、逆相HPLCにて分析した。

[0204] [化68]



[0205] 図7に示すように、オキシトシン-OXでは、15分から2時間経過後も、全くピークが変化しないのに対し、図8に示すオキシトシン-RDでは、わずか10分でピークが消失した。なお、15分付近の溶出されているブロードなピークは、α-キモトリプシン由来のピークと考えられる。

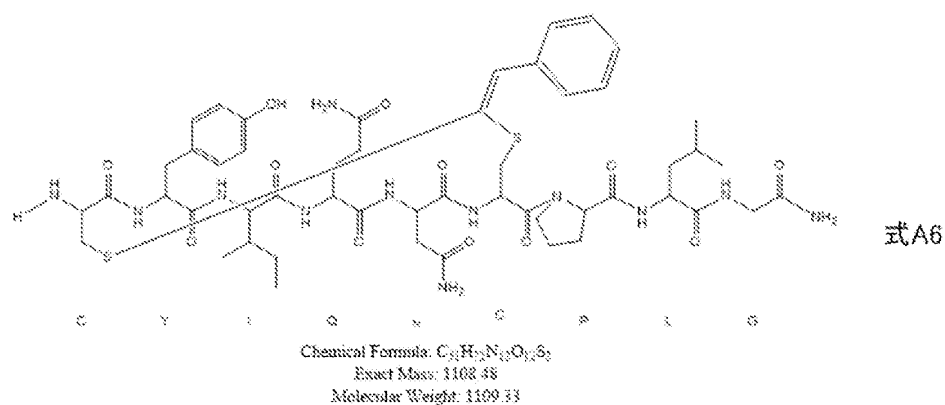
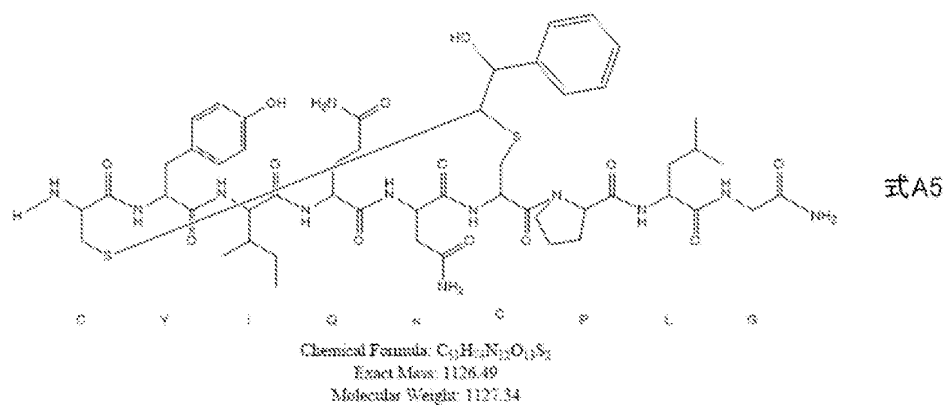
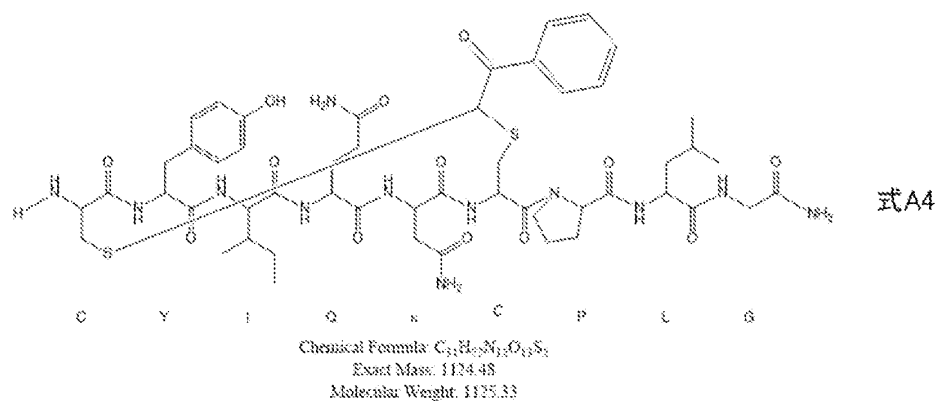
[0206] オキシトシン-DPから調製したサンプルの逆相HPLCの溶出クロマトグラムを図9に示す。この場合、2本のピークA及びBが現れた。質量分析により質量を解析したところ、ピークAは質量1126.7で、ピークBは

質量 1106.5 であった。これらは、下記式 A4 に示すオキシトシンジクロロアセトンフェノン架橋型（オキシトシン-DP）の質量の理論値 1125.34 と、その還元体（オキシトシン-DP-R、下記式 A5）が脱水したオキシトシン-DP-RDH（下記式 A6）の質量の理論値 1109.33 とほぼ一致した。このことから、このサンプルは、オキシトシン-DP とオキシトシン-DP-RDH の混合物であることが分かった。このサンプルに、重量比で 1/10 量の α -キモトリプシンを加えた反応を追跡したところ、オキシトシン-RD の場合とは異なり、オキシトシン-OX の場合と同様、 α -キモトリプシン添加後も、2 本のピークの減少は見られなかった。

[0207] α -キモトリプシン添加後のこれらの各分子種の変化量を見るため、ブランクのピーク面積に対する相対値（%）を時間に対しプロットした結果を図 10 に示す。オキシトシン-RD では、 α -キモトリプシン添加直後に急速にピークが消失したことから、極めてプロテアーゼに対する耐性が低いことが考えられるが、その SS 架橋体であるオキシトシン-OX では、 α -キモトリプシンの添加に対しても分解は見られず、高いプロテアーゼ耐性を有していることから、SS 結合による架橋が耐性に大きく寄与していることが分かる。一方、ジクロロアセトンフェノン架橋型（Oxytocin-DP と Oxytocin-DP-RDH）でも、還元剤 TCEP の存在下において、 α -キモトリプシン消化に対する高い耐性が見られた。このことは、本架橋方法が、ペプチドの安定性とリわけ、プロテアーゼに対する耐性（安定性）に大きく貢献できることを示している。

[0208]

[化69]



[0209] 本発明は、本発明の広義の精神と範囲を逸脱することなく、様々な実施の形態及び変形が可能とされるものである。また、上述した実施の形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、請求の範囲によって示される。そして、請求の範囲内及びそれと同等な発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

[0210] 本出願は、2020年11月9日に出願された日本国特許出願2020-186833号及び2021年5月14日に出願された日本国特許出願2021-82739号に基づく。本明細書中に日本国特許出願2020-186833号及び日本国特許出願2021-82739号の明細書、特許請求の範囲並びに図面全体を参照として取り込むものとする。

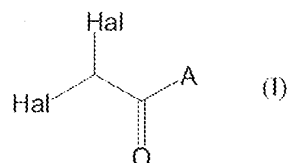
産業上の利用可能性

[0211] 本発明は、ペプチド及びタンパク質の架橋に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 下記式 (I) で表される、タンパク質又はペプチド用架橋剤。

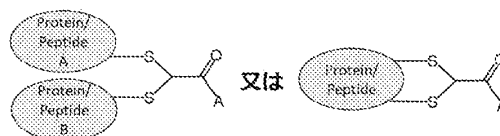
[化1]



[式中、Aは水素原子、フェニル基若しくはハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、又はフェニル基である]

[請求項2] 以下の式で表される単一の又は分離したタンパク質又はペプチドが有する少なくとも2つのチオール基が結合された、架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

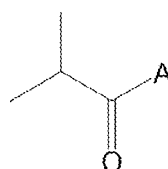
[化2]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

前記タンパク質又はペプチドを請求項1に記載の架橋剤と反応させて、前記2つのチオール基を以下の基

[化3]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基である]

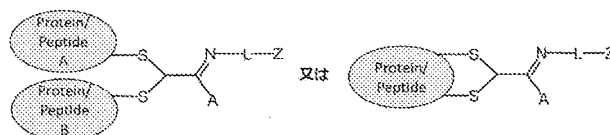
を介して互いに結合させることを含む方法。

[請求項3] 前記タンパク質又はペプチドが、前記少なくとも2つのチオール基の全部又は一部がジスルフィド結合を形成しているタンパク質又はペプチドであり、当該ジスルフィド結合を還元することにより2つのチオール基を生じさせることを含む、請求項2に記載の方法。

[請求項4] 請求項2又は3に記載の方法により前記タンパク質又はペプチド内のチオール基を結合させて架橋されたタンパク質又はペプチドを得ることを含む、タンパク質又はペプチドのアルカリ耐性を改善する方法。

[請求項5] 以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

[化4]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

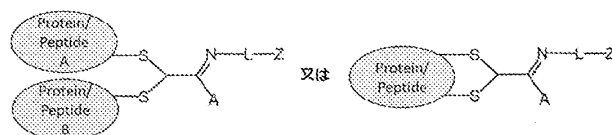
請求項2又は3に記載の方法により架橋されたタンパク質又はペプチドを得ること、

得られた架橋されたタンパク質又はペプチドとNH₂-L-Z（Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す）とを反応させることに

より、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に反応性官能基を導入することを含む方法。

[請求項6] 以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

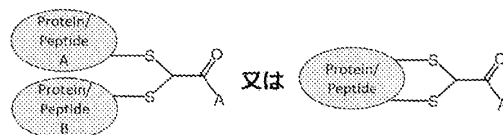
[化5]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

以下の式で表される架橋されたタンパク質又はペプチド

[化6]



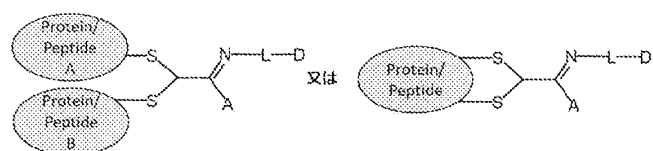
[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

と、 $\text{NH}_2\text{---L---Z}$ (Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す) とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に反応性官能基を導入することを含む方法。

[請求項7] 以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製

造する方法であって、

[化7]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

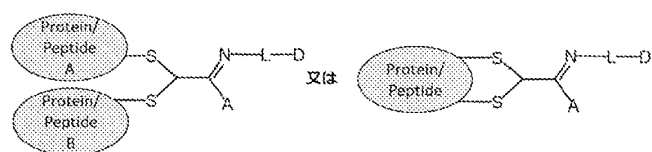
請求項5又は6に記載の方法により反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを得ること、

得られた反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドと、当該反応性官能基と反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、前記架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に前記薬剤を結合させることを含む方法。

[請求項8]

以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体を製造する方法であって、

[化8]

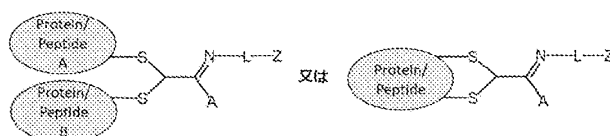


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

ptide Bとは同一又は異なっていてもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチド

[化9]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なっていてもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

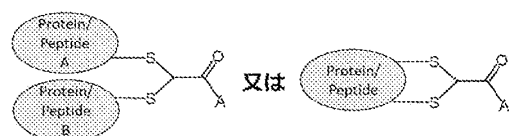
と、当該反応性官能基と反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に前記薬剤を結合させることを含む方法。

- [請求項9] 前記リンカーがタンパク質分解酵素により切断可能な部分を含む、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記タンパク質又はペプチドが、5～50アミノ酸のペプチドである、請求項2～9のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項11] 架橋されるチオール基が、単一のタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、請求項2～10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項12] 前記タンパク質又はペプチドが、Fc結合性ペプチドである、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 架橋されるチオール基が、分離したタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、請求項2～10のいずれか1項に記載の方法。

法。

[請求項14] 以下の式で表される、架橋されたタンパク質又はペプチド。

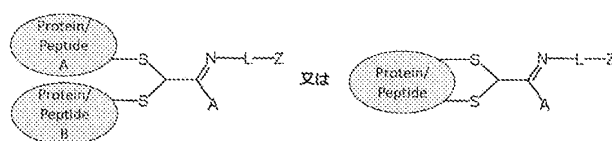
[化10]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよい]

[請求項15] 以下の式で表される、反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチド。

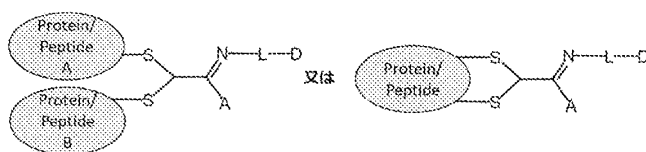
[化11]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6 アルキル基、フェニル基、C 1～6 アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

[請求項16] 以下の式で表されるタンパク質又はペプチドと薬剤との複合体。

[化12]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Protein/Peptide AとProtein/Peptide Bとは同一又は異なってもよく、Lはリンカーを表し、Dは薬剤を表す]

- [請求項17] 前記リンカーがタンパク質分解酵素により切断可能な部分を含む、請求項14に記載のタンパク質又はペプチド、請求項15に記載のタンパク質又はペプチド、若しくは請求項16に記載の複合体。
- [請求項18] 前記タンパク質又はペプチドが、5～50アミノ酸のペプチドである、請求項14～17のいずれか1項に記載のタンパク質、ペプチド又は複合体。
- [請求項19] 架橋されるチオール基が、単一のタンパク質又はペプチド内に存在するチオール基である、請求項14～18のいずれか1項に記載のタンパク質、ペプチド又は複合体。
- [請求項20] 前記タンパク質又はペプチドがFc結合性ペプチドである、請求項19に記載のタンパク質、ペプチド又は複合体。
- [請求項21] Fc結合性ペプチドにおける、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、アルギニン残基又は1位のアミノ酸のアミノ基が、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）、又はDSP（ジチオビス（スクシンイミジルプロピオン酸））で修飾されている、請求項20に記載のタンパク質、ペプチド又は複合体。
- [請求項22] 架橋されるチオール基が、分離したタンパク質又はペプチド内に存

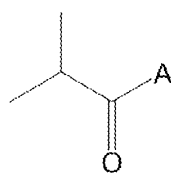
在するチオール基である、請求項14～18のいずれか1項に記載のタンパク質、ペプチド又は複合体。

[請求項23] I g GのFc領域を有する分子と、請求項20又は21に記載のタンパク質、ペプチド又は複合体とを接触させることを含む、架橋された前記Fc結合性ペプチドが結合した、I g GのFc領域を有する分子の製造方法。

[請求項24] 架橋されたFc結合性ペプチドが結合した、I g GのFc領域を有する分子の製造方法であって、

I g GのFc領域を有する分子に結合したFc結合性ペプチドと、請求項1に記載の架橋剤とを反応させて、前記Fc結合性ペプチド中の2つのチオール基を以下の基

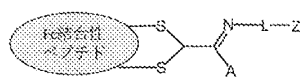
[化13]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基である]

を介して互いに結合させることを含む方法。

[請求項25] 以下の式で表される反応性官能基Zが結合したFc結合性ペプチド
[化14]

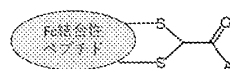


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

が結合した、I g GのFc領域を有する分子の製造方法であって、

以下の式で表される架橋されたFc結合性ペプチド

[化15]



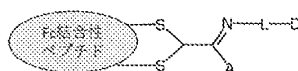
[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基である]

が結合した、IgGのFc領域を有する分子と、 $\text{NH}_2\text{-L-Z}$ （Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す）とを反応させることにより、前記架橋されたFc結合性ペプチドにおける架橋部分に反応性官能基を導入することを含む方法。

[請求項26]

以下の式で表される薬剤Dが結合したFc結合性ペプチド

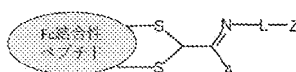
[化16]



が結合した、IgGのFc領域を有する分子の製造方法であって、

以下の式で表される反応性官能基Zが結合したFc結合性ペプチド

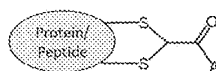
[化17]



[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表す]

が結合した、IgGのFc領域を有する分子と、当該反応性官能基Zと反応可能な官能基を有する薬剤とを反応させることにより、架橋されたタンパク質又はペプチドの架橋部分に薬剤を結合させることを含む方法。

- [請求項27] 前記Fc結合性ペプチドと、前記IgGのFc領域を有する分子とを共有結合させることをさらに含む、請求項23～26のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項28] 請求項20又は21に記載のタンパク質若しくはペプチド又は複合体が結合した、IgGのFc領域を有する分子。
- [請求項29] 前記Fc結合性ペプチドと、前記IgGのFc領域を有する分子とが共有結合している、請求項28に記載の分子。
- [請求項30] 請求項20又は21に記載のペプチドが結合した担体。
- [請求項31] IgGのFc領域を有する分子の精製方法であって、
IgGのFc領域を有する分子を含有する液体を請求項30に記載の担体に接触させること、
前記担体に結合しない成分を洗浄して除去すること、及び
前記担体に結合させた成分を溶出させて前記IgGのFc領域を有する分子を回収することを含む、方法。
- [請求項32] 以下の式で表されるタンパク質又はペプチドが有する少なくとも2つのチオール基が結合された、架橋されたタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、
- [化18]

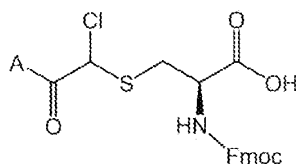


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC1～6アルキル基、フェニル基、C1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表す]

前記タンパク質又はペプチドをFmoc法により合成すること、及び

当該合成において、少なくとも1個のシステイン残基の代わりに以下の式

[化19]

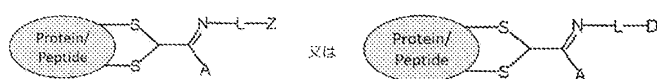


で表される化合物を用いることを含む方法。

[請求項33]

以下の式で表される反応性官能基が結合したタンパク質又はペプチドを製造する方法であって、

[化20]

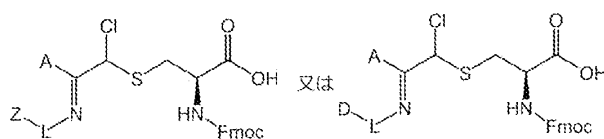


[式中、Aは水素原子、フェニル基又はハロゲン原子で置換されていてもよいC 1～6アルキル基、フェニル基、C 1～6アルキル基であり、Protein/Peptideはタンパク質又はペプチドを表し、Lはリンカーを表し、Zは反応性官能基を表し、Dは薬剤を表す]

前記タンパク質又はペプチドをFmoc法により合成すること、及び

当該合成において、少なくとも1個のシステイン残基の代わりに以下の式

[化21]



で表される化合物を用いることを含む方法。