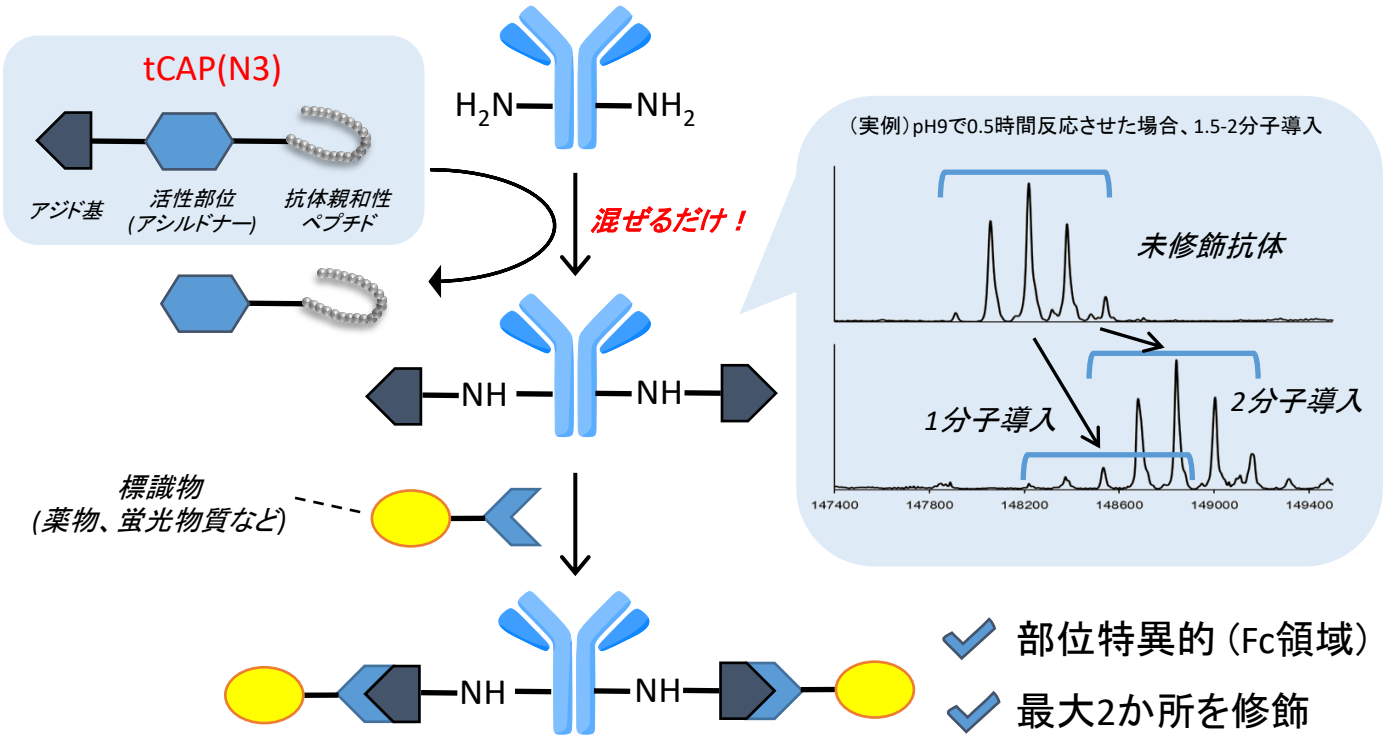
PEPTIDE

Fc領域内部位特異的−抗体修飾ペプチド！ ADC作製に
tCAP(N3)

様々な種の抗体(Native IgG)にアジド(N_3)基を導入する試薬で、抗体−薬物複合体(ADC)作製にご利用いただけます。Fc領域を部位特異的に最大2分子(重鎖に1分子ずつ)のアジド基で修飾でき、アジド基を介したクリック反応により様々な薬物や蛍光物質を導入可能です。中性緩衝液(pH7-9)に溶かした抗体にtCAP(N3)を添加するだけで、簡単に標識することができます。
ぜひ一度お試しください。



- ✔ 部位特異的 (Fc領域)
- ✔ 最大2か所を修飾

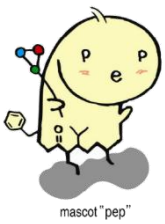
アジド基以外にテトラジンや蛍光物質、複数のアジド基などを導入したtCAP試薬もご提供可能です。tCAPによる抗体修飾サービスも検討中です。ぜひご相談ください。

コード	品名	容量	価格
3429-s	tCAP(N3)	0.1 mg*	¥ 30,000

*ヒトIgG1に対してtCAP試薬を4当量使う場合、約 700 μgの抗体を修飾可能。

tCAP(N3)は鹿児島大学の伊東教授との共同研究の成果です。(特許出願中)

詳しくはこちらのページにアクセスください！



株式会社 ペプチド研究所

電話:072-643-4480 FAX: 072-643-4422
https://www.peptide.co.jp/ E-mail: sales@peptide.co.jp

Introduction

tCAP(N3) 試薬は pH 7-9 の緩衝液中で，抗体に Ac-Lys(N_3)-Gly-Gly を修飾する試薬です。IgG の Fc 領域 Lys^{248} 特異的に 2 分子 (各重鎖に 1 分子ずつ) の Ac-Lys(N_3)-Gly-Gly を導入することができます。導入されたアジド基を介したクリック反応により ADC や蛍光標識抗体を調製可能です。

tCAP(N3) 試薬は，抗体に修飾されるペイロードとしてのアジドトリペプチド (Ac-Lys(N_3)-Gly-Gly) と活性アシルドナー部位，Fc 特異的な抗体親和性ペプチド部位からなります。中性緩衝液中の抗体に tCAP(N3) 試薬を加えると，抗体親和性ペプチドによって Fc 近傍に tCAP(N3) 試薬が配置されます。続いて抗体のリシン残基の側鎖アミノ基が活性部位を求核攻撃することで，抗体にアジドトリペプチドが転移し，アジド化抗体となります。その際，tCAP(N3) 試薬の構造において抗体親和性ペプチドとペイロードの間に位置している活性アシルドナー部位で反応するため，抗体にはペイロードであるアジドトリペプチドのみが導入されます。なお，抗体親和性ペプチドは反応後遊離しますが，抗体との親和性は維持されるため，抗体と非共有結合し系内から完全に取り除くには，pH 2.5 程度の解離バッファーにて抗体親和性ペプチドを解離させつつ限外ろ過などで除去する必要があります。

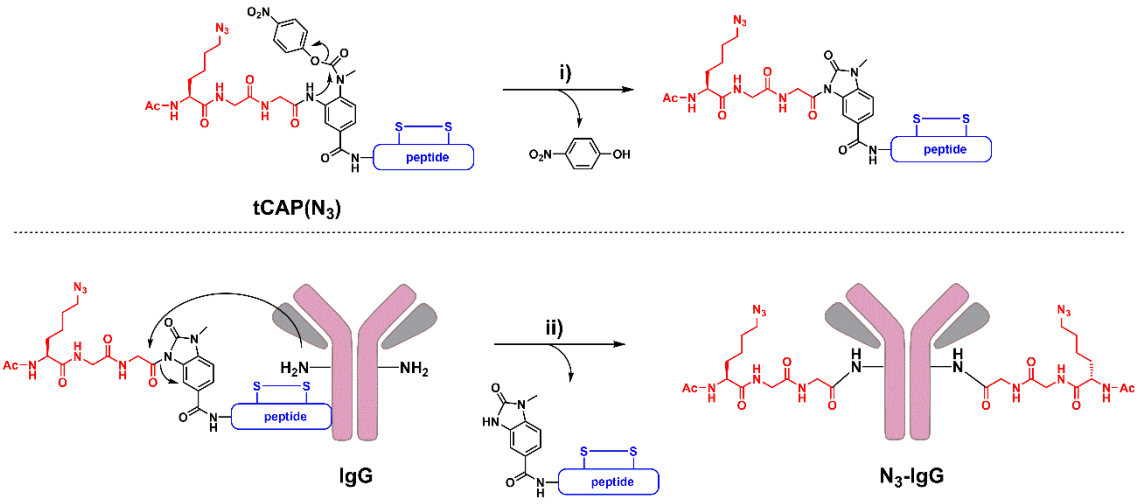


図 1. tCAP(N3) 試薬の修飾メカニズム

i) tCAP(N3) 試薬の活性アシルドナー部位は当初活性前駆体となっており，中性緩衝液中に加えることで速やかに活性型となります。ペイロード(赤)，活性アシルドナー(黒)，抗体親和性ペプチド(青)の 3 つの部位からなります。

ii) 抗体親和性ペプチドによって Fc 部位近傍に tCAP(N3) 試薬が配置されます。続いて抗体のリシン残基の側鎖アミノ基が活性アシルドナー部位を求核攻撃することで，抗体にアジドトリペプチドが転移しアジド化抗体となります。この際，アシルドナー部位を含む抗体親和性ペプチドは脱離します。

必要な試薬・器具例

・IgG 抗体

・tCAP(N3) 試薬：100 µM の水ストック溶液

・緩衝液：リン酸バッファー (pH 7.0)，HEPES バッファー (pH 8.0) もしくは carbonate-bicarbonate バッファー (pH 9.0)

・限外ろ過フィルター：例えば，Amicon Ultra Centrifugal Filter 30,000 NMWL

・解離バッファー：0.9% NaCl 入り 100 mM リン酸バッファー (pH 2.5)

製品に関する情報

・抗体

修飾可能な抗体種：tCAP(N3) 試薬の抗体親和性ペプチドはプロテイン A のフラグメントペプチド由来であるため，ヒト IgG1, IgG2, IgG4 だけでなく，マウス・ラビットなど，ヒト以外の種の IgG 抗体でも修飾可能と考えられます。

抗体濃度：0.67 mg/mL ~ 2.35 mg/mL (終濃度：0.50 ~ 2.00 mg/mL) での使用実績があります。tCAP(N3) 試薬は抗体に高い親和性を持つため，この範囲では終濃度と反応速度にあまり関係はありませんでした。

・tCAP(N3) 試薬の溶解方法

100 µM のストック溶液となるように純水に溶かします。

内容量 A mg※ の場合，以下の計算式に従って水を添加してください。

計算式：$[A \div 4798.2 \times 10^7]$ µL

※内容量はバイアルのラベルに表記されています。

(例えば，内容量が 0.11 mg (23 nmol) の場合，229 µL の純水を添加します。)

使用後は，−20℃ 程度以下で保存してください。

注意：試薬は中性緩衝液には溶解させないでください。活性アシルドナー部位が分解し，試薬が不活化します。純水に溶かしていただければ，−20℃ で 3 ヶ月程度は安定ですが，なるべく早く使い切ってください。

・tCAP(N3) 試薬の使用量

抗体に対して 4 当量添加することを推奨します。

・反応溶媒

リン酸バッファー (pH 7.0)，HEPES バッファー (pH 8.0) もしくは carbonate-bicarbonate バッファー (pH 9.0) を使用し，緩衝液成分の終濃度は 50 mM 以上としてくださる方が終 pH が変化しづらく安全です (tCAP(N3) 試薬のストック水溶液は弱酸性になっております)。修飾にかかる反応時間は pH が高いほど，短い傾向にあります。例えば, pH 9.0 の場合, 一般に 30 分で修飾が完了します (但し，この条件では tCAP(N3) 試薬は 1 時間程度で分解するため反応時間の延長はあ

まり意味がありません)。pH 8.0 の場合でも，終夜反応すれば，修飾は十分可能です (修飾量は多くのファクターにより変化しますが，たいてい 1~2 分子ほどの実績です)。pH 7.0 の場合でも，終夜反応すれば修飾可能ですが，修飾量は少なくなる傾向にあります (1 分子ほどしか入らなかった実績もあります)。 抗体の安定性次第ですが，pH 9 程度で 30 分処理とすることをお薦めいたします。2 分子修飾体を確実に得るために，必要に応じて，後述する精製後に再度修飾反応を実施してくださっても構いません。

・反応温度

室温で実施してください。

・精製法の例

反応後は，反応溶液を解離バッファーで 2 倍希釈して酸性とし，限外ろ過フィルターを用いて限外ろ過を実施してください。さらに，解離バッファーを加えて限外ろ過を 2 回ほど繰り返せば，抗体から抗体親和性ペプチドをほぼ完全に取り除くことができます。

中性バッファーで透析や限外ろ過を行う場合，過剰量の抗体親和性ペプチドは除去可能ですが，2 当量程度は抗体と非共有結合するため残存します。

・その後の DBCO 化合物とのコンジュゲート

室温でアジド化抗体と小過剰量の DBCO 化合物を中性緩衝液中にて混ぜるだけで，一般的には数時間で反応は完結し，その後，透析や限外ろ過にて目的修飾抗体を得ることが出来ます。なお，予め tCAP(N3) 試薬と DBCO 化合物とを DMSO 中にてコンジュゲートさせておくことも可能ですが，抗体修飾効率が低下する可能性があります。

実施例

【実施例 1】 トラスツズマブを carbonate-bicarbonate バッファー (pH9.0) で反応した例

使用した試薬

[修飾反応]

・抗体

トラスツズマブ 59 μM PBS 溶液 (8.7 mg/mL): 230 μL (14 nmol)

・tCAP(N3) 試薬

100 μM 水溶液: 520 μL (52 nmol, 4 当量)

・緩衝液

200 mM carbonate-bicarbonate バッファー (pH 9.0): 250μL

[終抗体濃度：13.5 μM (2.0 mg/mL), tCAP(N3) 濃度 54 μM, バッファー濃度 50 mM]

[精製]

・解離バッファー：0.9% NaCl 入り 100 mM リン酸バッファー (pH 2.5) 5mL

・限外ろ過フィルター：Amicon Ultra Centrifugal Filter 30,000 NMWL

実験操作

トラスツズマブの PBS 溶液 230 μL

↓200 mM carbonate-bicarbonate バッファー (pH 9.0) 250μL を添加

↓tCAP(N3) 試薬の水溶液 520 μL を添加

↓ 反応液を室温で 0.5 時間静置

↓ 反応液に解離バッファー 1 mL を加え，限外ろ過 (約 1/8 まで濃縮)

↓ 膜上濃縮液に解離バッファー 2 mL を加え，再度，限外ろ過 (約 1/8 まで濃縮)

↓ 膜上濃縮液に解離バッファー 2 mL を加え，再度，限外ろ過 (約 1/8 まで濃縮)

アジド化トラスツズマブ

修飾効率

LC-MS にて，1.8 分子程度のアジドトリペプチドの導入を確認しました。また，抗体親和性ペプチドが残存していないことは HPLC にて確認しました。

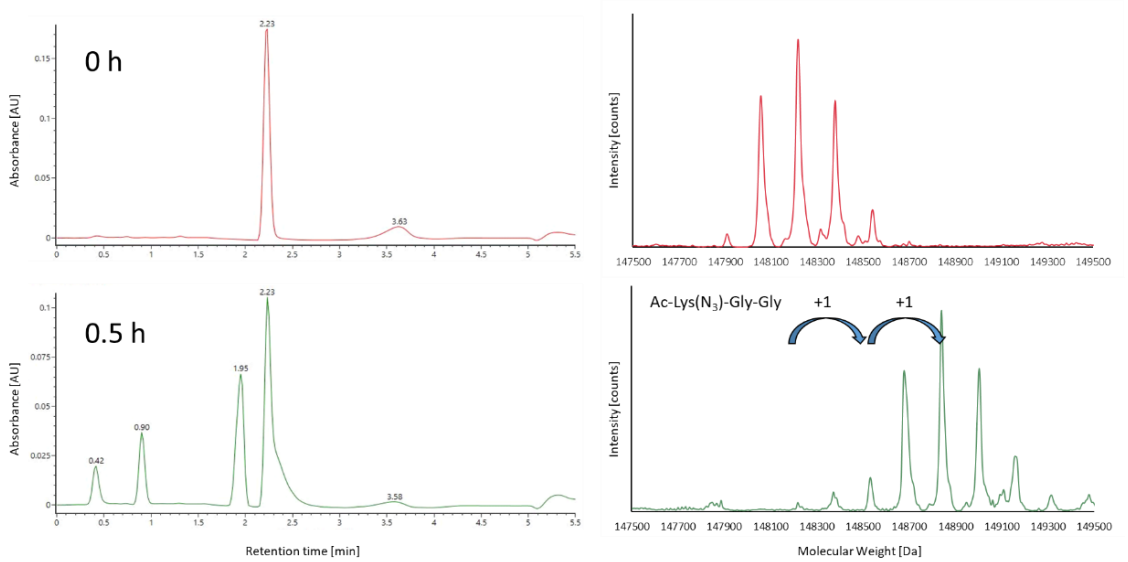


図 2. 反応 0.5 時間後の LC-TOF-MS 結果。左) 検出波長 280nm におけるクロマトグラム，右) IgG の MS スペクトル。修飾前後で IgG 分子の HPLC の溶出時間 (2.23 分) は変わらず，分子量のみが変化しています。

※ なお，この実験では，反応溶液に僅かに DMSO (終濃度 0.7%) を添加しました。

【実施例 2】 トラスツズマブを HEPES バッファー (pH8.0) で終夜反応した例

使用した試薬

[修飾反応]

・抗体

トラスツズマブ 11 µM PBS 溶液 (1.6 mg/mL): 128 µL (1.3 nmol)

・tCAP(N3)

100 µM 水溶液: 52 µL (5.4 nmol, 4 当量)

・緩衝液

500 mM HEPES バッファー (pH 8.0): 20 µL

[終抗体濃度：6.8 µM (0.5 mg/mL), tCAP(N3) 濃度 27 µM, バッファー濃度 50 mM]

実験操作

↓Trastuzumab の PBS 溶液 128 µL

↓500 mM HEPES バッファー 20 µL

↓tCAP(N3) 水溶液 30 µL

反応溶液は室温で，終夜静置した。

修飾効率

LC-MS にて，1.3 分子程度のアジドトリペプチドの導入を確認しました。

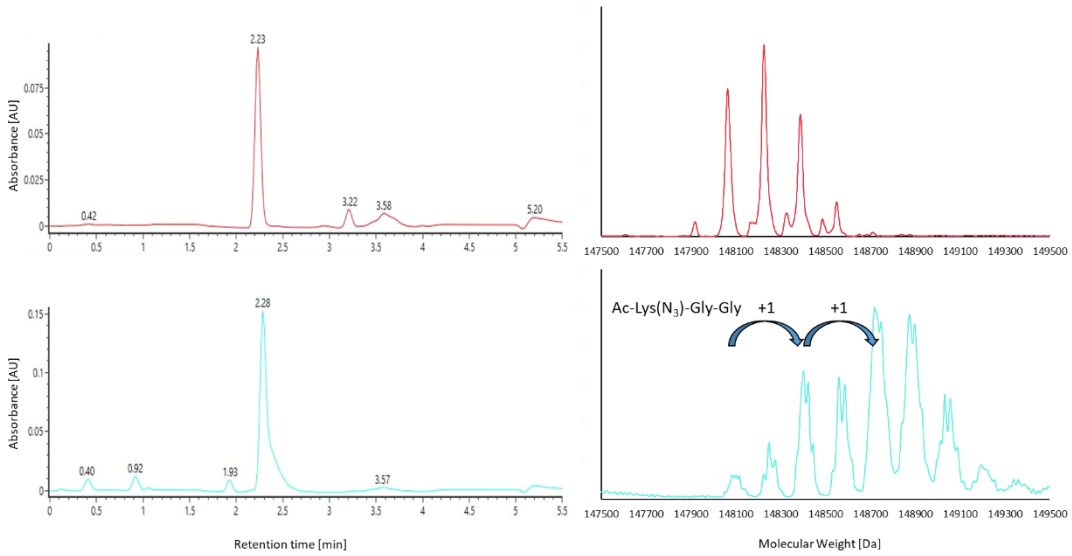


図 3. 反応 24 時間後の LC-TOF-MS 結果。左) 検出波長 280nm におけるクロマトグラム，右) IgG の MS スペクトル。修飾前後で IgG 分子の HPLC の溶出時間 (2.23 分) は変わらず，分子量のみが変化しています。(なお，反応 24 時間後の MS スペクトラムにおいては，一部ナトリウムイオンアダクトとして検出されているため，複雑なスペクトラムになっています。)

tCAP(N3)は鹿児島大学の伊東教授との共同研究の成果です。(特許出願中)
また，抗体の放射性標識目的での本製品の利用は，契約により制限されます。
詳細はお問い合わせください。