

English version follows the Japanese version.

tCAP(N3)試薬

tCAP(N3)試薬は pH 7-9 の緩衝液中で、抗体に Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly を修飾する試薬です。IgG の Fc 領域 Lys248 特異的に 2 分子(各重鎖に 1 分子ずつ)の Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly を導入することができます[1]。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。また、tCAP 法を用いた ADC の調製・評価例が報告されています[2]。

tCAP(N3)試薬は以下の 3 種類の構造から構成されます(図 1.(i))。

- ① 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(N₃)-Gly-Gly)
- ② 活性アシルドナー部位
- ③ Fc 特異的な親和性ペプチド部位

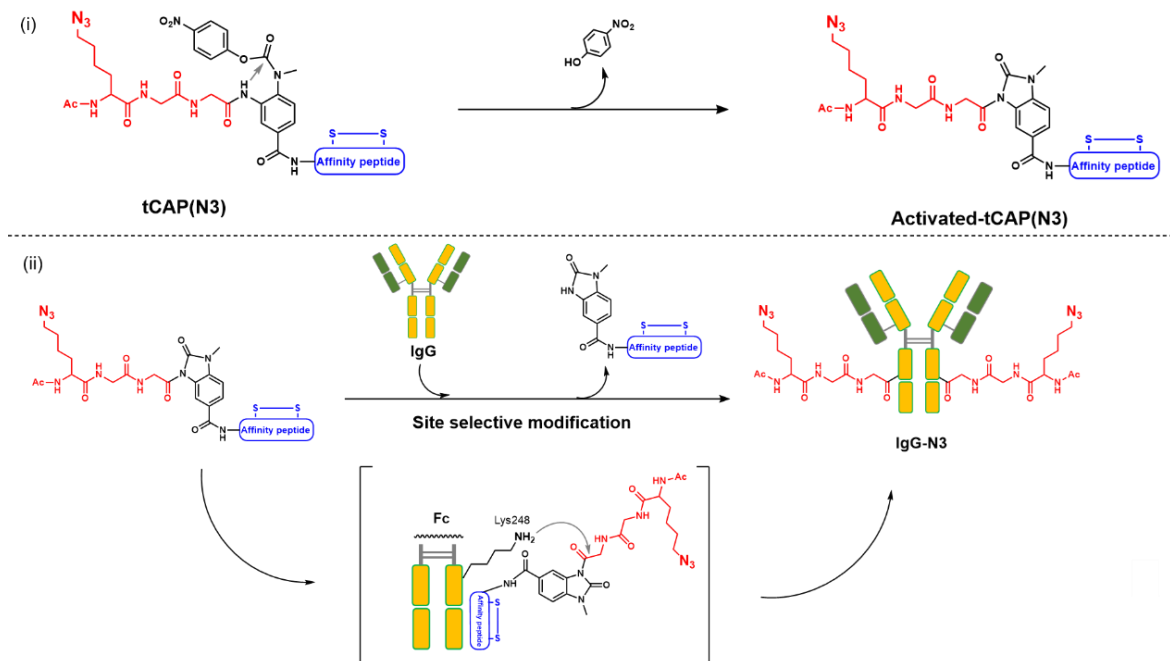


図 1. tCAP(N3)試薬の修飾メカニズム

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(Lys248)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(IgG-N₃)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(図 1 (ii))。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非共有結合で抗体に付着したままになります。抗体親和性ペプチドを取り除くには、pH 3.3 程度のバッファーでペプチドを解離させつつ、限外ろ過や透析、ゲルろ過などで除去する必要があります。但し、仮に親和性ペプチドが残留したとしても、それらは可逆的な非共有結合を介して結合しているに過ぎないため、抗体の FcRn への結合や薬物動態に大きな影響を及ぼすとは考えておりません。

プロトコル

【必要な試薬】

- ・ IgG 抗体：濃度：1.0~10.0 mg/mL (=約 6.7~67 μ M) をご用意ください。
- ・ 100 μ M tCAP(N3) in H₂O

バイアルに記載されているネット含量に従って、終濃度 100 μ M になるように純水を添加してください。(tCAP(N3)の分子量=4798.2) 例えば、ネット含量が 0.11 mg なら 229 μ L の純水を添加してください。

注意：tCAP(N3)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。

【保存方法】100 μ M tCAP(N3) in H₂O のストック溶液は-20℃で冷凍保存してください。

- ・ 緩衝液：200 mM 炭酸バッファー (pH 8.9)

【精製に必要なモノ】

- ・ 10% 酢酸水溶液
- ・ 150 mM NaCl/0.1% 酢酸水溶液(pH3.5) など
- ・ 透析チューブまたはゲルろ過カラム(Sephadex® G-50 カラム、例えば 1 × 20 cm、Bio-Rad エコノカラムなど)

抗体修飾反応

この方法で抗体修飾を行った場合、DAR は通常 1.5-1.8(最大 2)となります。

1. tCAP(N3)試薬の添加：抗体に tCAP(N3)の水ストック溶液を抗体とのモル比 **1:4~5** (抗体：tCAP(N3)試薬) になるように添加して、ボルテックスで攪拌する。
2. 親和性ペプチドと抗体との結合：10 分間攪拌する。
注意：凝集しやすい抗体には NaCl の添加が有用な場合もあります。
3. pH 調整：抗体に炭酸バッファー(pH 8.9)を加える。この際、pH 8.9 であることを必ず確認してください。pH が低いと DAR が小さくなります。
4. 抗体修飾反応：室温で 2 時間攪拌する。
5. 精製：目的に応じて、以下の 3 通りのパターンから選択してください。

① [抗体が酸性条件下で不安定な場合]

中性バッファーで透析する。

この方法で抗体には 2.0 分子の親和性ペプチドが残存します。

② [親和性ペプチドを除く場合：透析法]

10%酢酸水を反応液の 1/10 量添加してクエンチする。反応液を透析チューブに移し、150 mM NaCl/0.1% 酢酸溶液(pH3.5)で一晩透析する。その後、中性バッファで透析する。

この方法で抗体には 0.4 分子程度の親和性ペプチドが残存します。

③ [親和性ペプチドを除く場合：ゲルろ過法]

10%酢酸を反応液の 1/10 量添加してクエンチする。反応液を 150 mM NaCl/0.1% 酢酸溶液(pH3.5)で平衡化した Sephadex G-50 カラムに通し、素通り画分を回収する。その後、回収分を中性バッファで透析する。

この方法で抗体上の親和性ペプチドが完全に除去できます。

6. 完成: この修飾反応により、IgG-N₃ (通常 DAR : 1.5–1.8 程度)が得られます。

※ **DAR ≈ 2.0** にしたい場合は、2 段階の抗体修飾反応が有効です。詳しいプロトコルやその他お困りの方は、sales@peptide.co.jp にお問い合わせください。

クリック反応

1. DBCO 試薬の添加: IgG-N₃ に対して、モル比 1:3 (IgG-N₃ : DBCO 試薬) になるように添加する。
2. 修飾反応: 室温で 3~4 時間攪拌する。(分子サイズに応じ時間延長が必要な場合があります)
3. 精製: DBCO 試薬を透析や限外ろ過などで除去する。

実施例: Trastuzumab (Tmab)の抗体修飾

[用意した試料]

- ・ Trastuzumab (Tmab) 0.5 mg 濃度: 8.7 mg/mL (= 58 μM) in PBS
- ・ tCAP(N3): 100 μM tCAP(N3) in H₂O (0.11 mg バイアル 1 本に 229 μL の純水を添加)
- ・ 200 mM 炭酸バッファ (pH 8.9)

[実験手順]

- ↓ 8.7 mg/mL (= 58 μM) of Trastuzumab (Tmab) in PBS = 58 μL (3.36 nmol)
- ↓ 100 μM tCAP(N3) in H₂O を添加 = 134 μL (13.4 nmol, 4 eq)
- ↓ 室温で 10 分間攪拌
- ↓ 200 mM 炭酸バッファ (pH 8.9) を添加 = 63 μL
- ↓ 室温で 2 時間攪拌 [終抗体濃度: 13 μM (2.0 mg/mL)、炭酸バッファ終濃度 50 mM]
- ↓ 中性バッファで透析
- ↓ LC-MS で修飾効率を確認

IgG-N₃

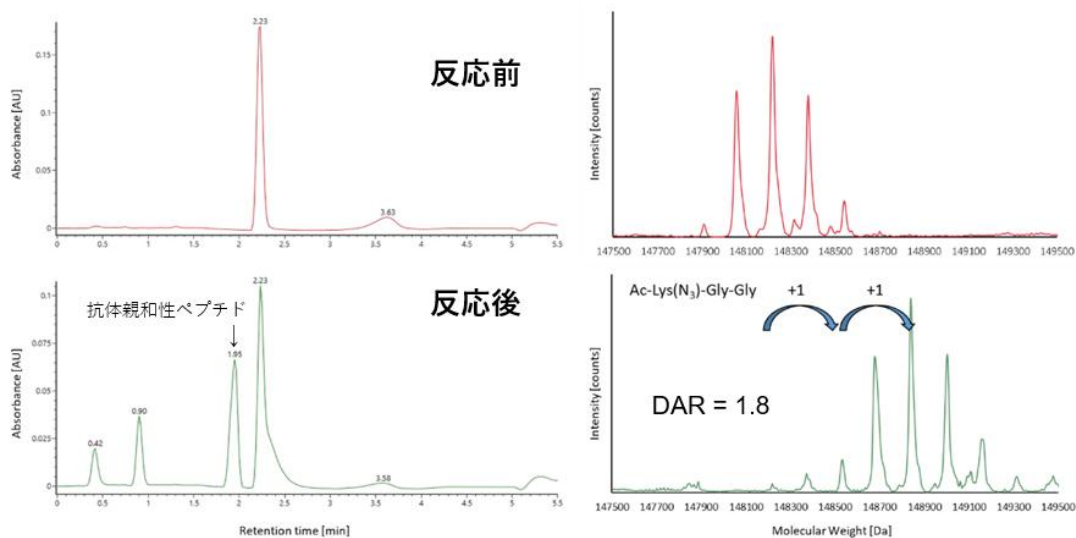


図 2. 反応後の LC-TOF-MS 結果。

左) 検出波長 280 nm 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。抗体 1 分子に対して Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly は約 1.8 分子 (DAR=1.8) となりました。

その他製品に関する情報

- ・抗体修飾可能な抗体種：ヒト IgG1、IgG2、IgG4、マウス IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ラビット IgG など

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、Protein A と結合しうる抗体は修飾可能と考えられます。

- ・抗体修飾反応の pH：pH7 や pH8 でも修飾反応は可能ですが、DAR は小さくなります。

使用制限のご案内

本製品は、鹿児島大学との特許ライセンス契約のもとに販売しております。
放射性医薬品への利用は、契約により制限されています。

参考文献

- [1] H. Kawakami, A. Rafique, S. Tsuda, A. Nagashima, Y. Nohara, N. Dozono, K. Sakamoto, S. Masuda, M. Kiyoshi, H. Shibata, A. Ishii-Watabe, T. Yoshiya, and Y. Ito, *Chem.Eur.J.*, **32**, e03144 (2026). [2] K. Tsuji, Y. Miura, T. Kuwata, R. Matsuzaki, T. Kobayakawa, K. Matsumoto, Y. Ito, T. Yoshiya, S. Matsushita, and H. Tamamura, *ChemMedChem*, **21**, e202500820 (2026).

Introduction

The **tCAP(N3)** reagent is designed to modify antibodies by conjugating the **Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly** peptide in a buffer at pH 7–9. This reagent specifically introduces two molecules of Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly into the **Lys248 residue** of the antibody's **Fc region** (one molecule per heavy chain). [1] The introduced azide groups enable the preparation of antibody-drug conjugates (ADCs) or fluorescently labeled antibodies via downstream click chemistry. Structurally, the tCAP(N3) reagent consists of three functional components (**Fig1.(i)**). The preparation and evaluation of ADCs using tCAP chemistry have also been reported [2].

1. **An azide tripeptide (Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly)** that serves as the payload modified onto the antibody.
2. An active acyl donor site.
3. **An Fc-specific affinity peptide moiety.**

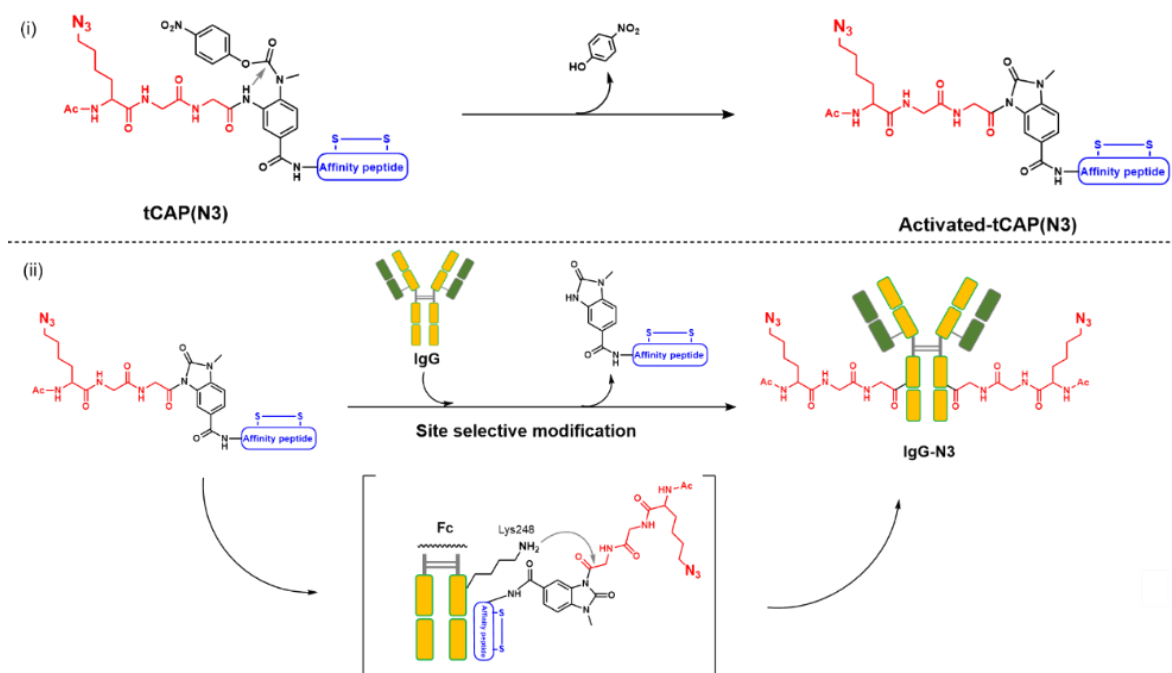


Figure 1. Modification Mechanism of the tCAP(N3) Reagent

When the tCAP(N3) reagent is added to an antibody solution in a neutral buffer, the affinity peptide directs and positions the reagent near the Fc region. Subsequently, the side-chain amino group of the antibody's lysine (Lys248) residue nucleophilically attacks the active site. This reaction transfers the azide tripeptide onto the antibody, yielding the azide-functionalized antibody (IgG-N₃). Because the reaction occurs at the active acyl donor site located between the affinity peptide and the payload within

the reagent structure, only the azide tripeptide payload is successfully introduced into the antibody (**Fig1. (ii)**). Although the affinity peptide is released after the transfer reaction, their affinity for the antibody is maintained, so they remain attached to the antibody via non-covalently bound. Therefore, to completely eliminate the affinity peptide from the system, it must be dissociated using a dissociation buffer at approximately pH 3.3, followed by removal techniques such as dialysis, ultrafiltration, or gel filtration column. **Even if some affinity peptides remain, they are attached only via reversible noncovalent bonds; therefore, they are not expected to significantly affect the antibody's binding to FcRn or its pharmacokinetics.**

Protocols

[Reagent and Sample Preparation]

- IgG Concentration: Prepare the IgG solution in PBS at a concentration of 1–10 mg/mL (approx. 6.7–67 μ M)
- 100 μ M tCAP(N3) in H₂O stock solution
(tCAP(N3) Stock Solution (100 μ M): Dissolve in H₂O according to the vial's net weight (tCAP(N3) MW = 4798.2) to obtain a 100 μ M concentration. Example: Add 229 μ L of H₂O for a 0.11 mg vial)

Caution: Do not dissolve the tCAP(N3) reagent in a neutral buffer. The reagent will decompose and become inactive.

Storage: Store the 100 μ M tCAP(N3) stock solution in H₂O in a -20°C freezer.

- 200 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9)

[Materials for Affinity Peptide Removal]

- 10% of AcOH aq.
- 150 mM NaCl/0.1%AcOH aq.
- dialysis tube or a gel filtration column (such as a Sephadex® G-50 column).

Protocol 1: Standard Method (DAR: Max 2, but typically to afford 1.5–1.8)

1. **Mixing:** Add tCAP(N3) (100 μ M in H₂O) to the IgG solution at a **1:4–5 molar ratio** (antibody : reagent), and mix vigorously.
2. **Affinity Binding:** Incubate the mixture for 10 min to allow affinity binding.
Note: The addition of NaCl can be effective for antibodies that are prone to aggregation.
3. **pH Adjustment:** Add 200 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9), relative to the initial IgG solution volume to adjust the pH.
Note: Please check the pH. A low pH will decrease the DAR.
4. **Conjugation:** Incubate the solution for 2 h at room temperature.
5. **Purification:** Depending on your requirements, please choose one of the following three

methods:

5-1. For Acid-Sensitive IgG:

If the target IgG is unstable under acidic conditions, perform the dialysis against a neutral pH buffer.

Note: Under neutral conditions, the affinity peptide cannot be removed, **leaving 2.0 equivalents** in the sample.

5-2. Standard Purification (Partial peptide removal)

Quench the reaction by adding 10 vol% of 10% AcOH aq. relative to the initial IgG solution volume (this adjusts the mixture to approximately pH 3.3). Dialyze the sample against a buffer containing 150 mM NaCl/0.1%AcOH aq. to remove unreacted peptides. Subsequently, perform a second dialysis against PBS to neutralize the pH.

Note: This standard method results in incomplete affinity peptide removal, leaving approximately **0.4 equivalents** of the peptide in the sample.

5-3. Advanced Purification (complete peptide removal)

Quench the reaction by adding 10 vol% of aqueous 10% AcOH aq. relative to the initial IgG solution volume (this adjusts the mixture to approximately pH 3.3). Purify the sample using a gel filtration column (such as a Sephadex® G-50 column, equilibrated and eluted with 150 mM NaCl/0.1%AcOH aq.), and collect the flow-through fraction. Subsequently, dialyze the collected fraction against a neutral buffer.

Note: This standard method achieves **complete affinity peptide removal**.

6. Yield: This process yields IgG-N₃ with a DAR of 1.5–1.8.

Technical Notes:

*To obtain IgG-N₃ with a higher drug-to-antibody ratio (**DAR ≈ 2.0**), the reaction must be repeated.*

Please contact us at (sales@peptide.co.jp) to obtain the detailed protocols.

Protocol 2: Downstream Click Reaction

4. **Mixing:** Mix the obtained IgG-N₃ with the DBCO-reagent at a 1:3 molar ratio.
5. **Conjugation:** Incubate the reaction mixture for 3~4 h at room temperature. (Extended reaction time may be required depending on the molecular size and structure of the DBCO compound.)
6. **Purification:** Remove the remaining unreacted DBCO reagents via dialysis or ultrafiltration.

Examples: Modification to Trastuzumab (Tmab)

[samples]

- Trastuzumab (Tmab) 0.5 mg Concentration : 8.7 mg/mL(= 58 μM) in PBS

- tCAP(N3) : 100 μ M tCAP(N3) in H₂O (add 229 μ L H₂O to 0.11 mg vial)
 - 200 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9)
 - ↓ 8.7 mg/mL (= 58 μ M) of Trastuzumab (Tmab) in PBS = 58 μ L (3.36 nmol)
 - ↓ Add 100 μ M tCAP(N3) in H₂O = 134 μ L (13.4 nmol, 4 eq)
 - ↓ Stir 10 min at room temperature
 - ↓ Add 200 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9) = 63 μ L
 - ↓ Stir 2 hours at room temperature
- [Final IgG concentration : 13 μ M (2.0 mg/mL), Final carbonate-bicarbonate buffer concentration 50 mM]
- ↓ Dialysis against neutral buffer
 - ↓ Check the DAR by LC-MS

IgG-N₃

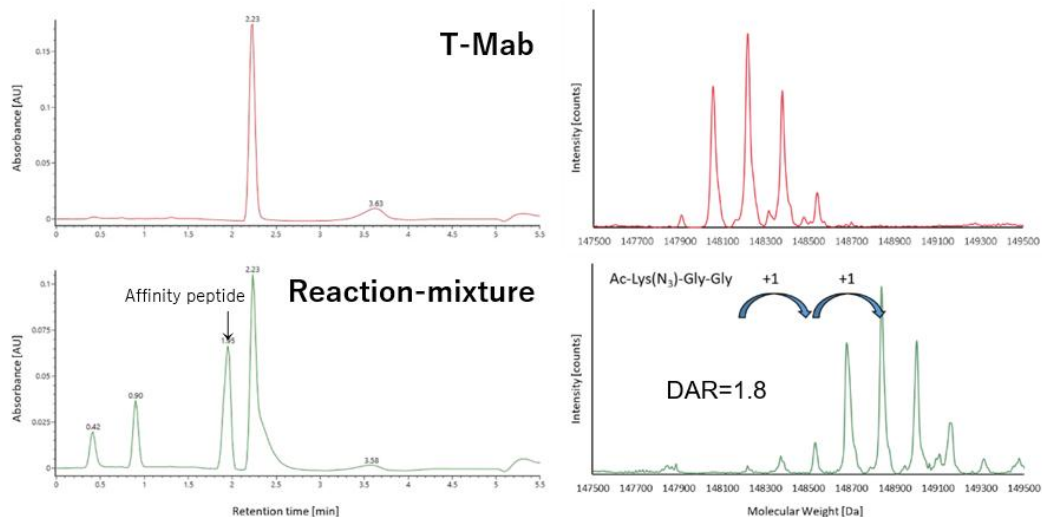


Figure 2. LC-TOF-MS analysis results. Left) LC chromatogram detected at 280 nm. Right) MS spectrum of the IgG conjugate. While the retention time of T-Mab remained unchanged after the modification, the MS spectrum showed a distinct shift. This result indicated that approximately 1.8 equivalents of Ac-Lys(N₃)-Gly-Gly were successfully conjugated to the antibody, confirming a DAR of 1.8.

Product Information

Supported Antibody Species

Applicable Species: Human IgG1, IgG2, IgG4; Mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3; Rabbit IgG, etc.

Note: The antibody affinity peptide of the tCAP(N3) reagent is derived from a Protein A fragment peptide. Therefore, any antibody capable of binding to Protein A is considered

compatible with this modification method.

Reaction pH and DAR

While the modification reaction can proceed at pH 7.0 or 8.0, performing the reaction under these conditions will result in a lower drug-to-antibody ratio (DAR). For optimal DAR results, following the recommended protocol pH is highly advised.

Notice of Usage Restrictions & Licensing

This product is sold under a patent license agreement with Kagoshima University. Utilization for radioactive pharmaceuticals is prohibited under this agreement.

Reference

- [1] H. Kawakami, A. Rafique, S. Tsuda, A. Nagashima, Y. Nohara, N. Dozono, K. Sakamoto, S. Masuda, M. Kiyoshi, H. Shibata, A. Ishii-Watabe, T. Yoshiya, and Y. Ito, *Chem.Eur.J.*, **32**, e03144 (2026).
- [2] K. Tsuji, Y. Miura, T. Kuwata, R. Matsuzaki, T. Kobayakawa, K. Matsumoto, Y. Ito, T. Yoshiya, S. Matsushita, and H. Tamamura, *ChemMedChem*, **21**, e202500820 (2026).