[0005] で示される抗腫瘍性化合物（エキサテカン、化学名：(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ［de］ピラノ［3',4':6,7］インドリジノ［1,2-b］キノリン-10,13（9H,15H）-ジオン）は、水溶性のカンプトテシン誘導体である（特許文献１、２）。現在臨床で用いられているイリノテカンとは異なり、酵素による活性化が不要である。また、イリノテカンの薬効本体であるSN-38や、同じく臨床で用いられているトポテカンよりもトポイソメラーゼＩ阻害活性が強く、in vitroで種々の癌細胞に対して、より強い殺細胞活性を有している。特にP-glycoproteinの発現によってSN-38等に耐性を示す癌細胞に対しても効果を示した。また、マウスのヒト腫瘍皮下移植モデルでも強い抗腫瘍効果を示し、臨床試験が行われたが上市には至っていない（非特許文献５～１０参照）。エキサテカンがADCとして有効に作用するかについては明らかではなかった。

[0006] DE-310は、生分解性のカルボキシメチルデキストランポリアルコールポリマーにエキサテカンをGGFGペプチドスペーサーを介して結合させた複合体である（特許文献３）。エキサテカンを高分子プロドラッグ化することによって、高い血中滞留性を保持させ、さらに腫瘍新生血管の透過性の亢進と腫瘍組織滞留性を利用して、受動的に腫瘍部位への指向性を高めたものである。DE-310は、酵素によるペプチドスペーサーの切断によって、活性本体であるエキサテカン、およびグリシンがアミノ基に結合しているエキサテカンが持続的に遊離される。その結果、薬物動態が改善され、非臨床試験における種々の腫瘍の評価モデルにおいて、DE-310はエキサテカンの投与量がエキサテカン単剤の投与時よりも減少しているのにも拘らず、エキサテカン単剤の投与時よりもより高い有効性を示した。DE-310に関しては臨床試験が実施され、ヒトにおいて有効例が確認され、活性本体が正常組織よりも腫瘍に集積することが確認されたという報告がある一方で、ヒトにおける腫瘍へのDE-310及び活性本体の集積は正常組織への集積と大差なく、ヒトでは受動的なターゲティングは見られなかったとの報告もある（非特許文献１１～１４参照）。結果としてDE-310も上市には至らず、エキサテカンがこのようなターゲティ

ングを指向した薬物として有効に機能するかについては明らかではなかった。

DE-310の関連化合物として、-NH(CH$_2$)$_n$C(=O)-で示される構造部分を-GGFG-スペーサーとエキサテカンの間に挿入し、-GGFG-NH(CH$_2$)$_n$C(=O)-をスペーサー構造とする複合体も知られているが（特許文献４）、同複合体の抗腫瘍効果については全く知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開平５－５９０６１号公報

特許文献2：特開平８－３３７５８４号公報

特許文献3：国際公開ＷＯ１９９７/４６２６０パンフレット

特許文献4：国際公開ＷＯ２０００/２５８２５パンフレット

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ducry, L., et al. Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.; Antibody-Drug Conjugates: Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies.

非特許文献2：Alley, S. C., et al. Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.; Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer.

非特許文献3：Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.; Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin.

非特許文献4：Senter P. D., et al. Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.; The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma.

非特許文献5：Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.; Antitumour activity of DX-8951f: a new

camptothecin derivative.

非特許文献6：Mitsui, I., Kumazawa, E., Hirota, Y., et al. Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-786.; A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors in vitro and in vivo.

非特許文献7：Takiguchi, S., Tohgo, A., et al. Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.; Antitumor effect of DX-8951, a novel camptothecin analog, on human pancreatic tumor cells and their CPT-11-resistant variants cultured in vitro and xenografted into nude mice.

非特許文献8：Joto, N. et al. Int J Cancer (1997) 72, 680-686.; DX-8951f, a water-soluble camptothecin analog, exhibits potent antitumor activity against a human lung cancer cell line and its SN-38-resistant variant.

非特許文献9：Kumazawa, E. et al. Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.; Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice.

非特許文献10：De Jager, R., et al. Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.; DX-8951f: summary of phase I clinical trials.

非特許文献11：Inoue, K. et al. Polymer Drugs in the Clinical Stage, Edited by Maeda et al. (2003), 145-153.; CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate, DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data.

非特許文献12：Kumazawa, E. et al. Cancer Sci (2004) 95, 168-175.; DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f: Potent antitumor activities in v

arious murine tumor models.

非特許文献13：Soepenberg, O. et al. Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.; Phase I and pharmacokinetic study of DE-310 in Patients with Advanced Solid Tumors.

非特許文献14：Wente M. N. et al. Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.; DE-310, a macromolecular prodrug of the topoisomerase-I-inhibitor exatecan (DX-8951), in patients with operable solid tumors.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 抗体による腫瘍の治療においては、抗体が抗原を認識して腫瘍細胞に結合しても抗腫瘍効果が十分でない場合が観察されることもあり、より効果の高い抗腫瘍抗体が必要とされる場合がある。また、抗腫瘍性の低分子化合物においては、抗腫瘍効果に優れていても副作用や毒性面等、安全性上の問題を有するものが多く、低分子抗腫瘍化合物については、安全性をより高めてより優れた治療効果を獲得することも課題である。すなわち本発明は、抗腫瘍効果と安全性面に優れる、優れた治療効果を有する抗腫瘍薬を獲得して提供することが課題である。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは抗腫瘍性化合物であるエキサテカンを、リンカー構造部分を介して、腫瘍細胞を標的にできる抗体、すなわち、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞に内在化できる特性、あるいは腫瘍細胞に細胞障害性を有する特性のいずれか一又はそれ以上の特性を備えた抗体、に結合させた化合物である抗体－薬物コンジュゲートに変換することによって、腫瘍細胞に細胞障害性を有する抗体であればその細胞障害性の増強が達成できること、さらに抗腫瘍性化合物を腫瘍細胞により確実に移動させて当該化合物の抗腫瘍効果を腫瘍細胞で特異的に発揮させることができること、したがって抗腫瘍効果の確実な発揮とともに抗腫瘍性化合物の投与量

OnCusp
Ex. 1002

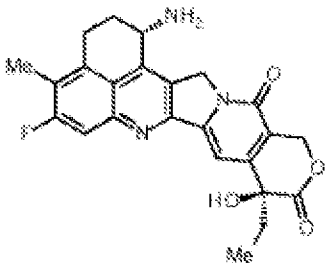
が当該化合物の単体投与時よりも減少させることができるのでより高い安全性を達成できること、が可能と考えた。

このために本発明者らは特定の構造のリンカーを創出し、このリンカーを介して抗体とエキサテカンとを結合させた抗体－薬物コンジュゲートを獲得することに成功し、そしてこの化合物が優れた抗腫瘍効果を発揮することを見出して本発明を完成させたのである。

[0011] すなわち本願発明は、

[１] 次式

[化2]



で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体－薬物コンジュゲートに関するものである。

[0012] ここで、抗体はL^1の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、L^cの末端において結合し、

式中、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、$-CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-を示し、

ここで、n^2は、２から８の整数を示し、n^3は、１から８の整数を示し、n^4は、１から８の整数を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2$-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-、-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-、又は単結合を

示し、

ここで、n^6は、１から６の整数を示し、n^6は、１から６の整数を示し、

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^8は、-C(=O)-NH-、$-NR^1-(CH_2)n^7-$、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-COOH$、又は$-(CH_2)n^9-OH$を示すが、n^8は、整数の１から４を示し、n^9は、１から６の整数を示し、

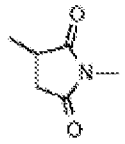
L^9は、$-CR^2(-R^3)-$、-O-、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^5-NH_2$、$-(CH_2)n^6-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$を示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^5は、０から６の整数を示し、n^6は、整数の１から４を示し、n^cは、整数の１から４を示すが、n^5が０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

L^cは、$-CH_2-$又は-C(=O)-を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

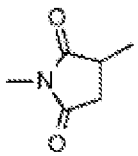
[化3]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[化4]



で示される構造であり、このものの３位でL^8と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

L^2が-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-のとき、L^1は-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-Ly-3-diminiccuS)-となる。

[0013] さらに本願発明は以下の各々に関するものでもある。

［２］L^Pが、-C(=O)-である［１］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３］抗体とL^1との結合が、

抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合、

抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたジスルフィド結合、又は

抗体を構成するアミノ酸の側鎖上に存在するアミノ基または末端のアミノ基において形成させたアミド結合、

である［１］又は［２］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

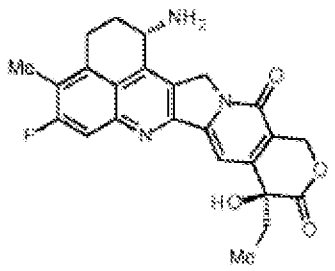
［４］L^Pのペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるアミノ酸残基である［１］から［３］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［５］L^Pが、４個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である［１］から［３］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［６］L^Pが、-GGFG-である［１］から［３］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0014] ［７］次式

[化5]



で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

-L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^3$-L^4-L^5-L^6-

で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体－薬物コンジュゲート。

[0015] ここで、抗体はL^1の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、L^6の末端において結合し、

式中、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-Ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-を示し、

ここで、n^2は、２から８の整数を示し、n^3は、１から８の整数を示し、n^4は、１から８の整数を示し、

L^2は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-、-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、n^6は、１から６の整数を示し、

L^Pは、GGFGのテトラペプチド残基を示し、

L^4は、-O-又は単結合を示し、

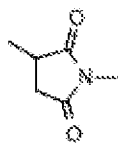
L^5は、-CR^2(R^3)-又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は水素原子を示し、

L^6は-C(=O)-を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

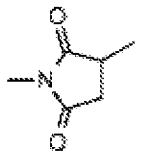
[化6]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[化7]



で示される構造であり、このものの３位でL^2と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

L^2が-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-のとき、L^1は-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-となる。

[0016] ［８］L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-又は-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-である［１］から［７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［９］L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-である［１］から［７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１０］L^1が、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-又は-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-である［１］から［７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１１］n^2が、２から５の整数であって、L^2が、単結合である［１］から［９］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１２］n^2が、２から５の整数であって、L^2が、-NH-$(CH_2CH_2O)n^6$-CH_2-CH_2-C(=O)-であり、n^6が、２又は４である［１］から［９］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１３］-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-が、４から７原子の鎖長を有する部分構造である［１］から［１２］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１４］-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-が、５又は６原子の鎖長を有する部分構造である［１］から［１２］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート

OnCusp
Ex. 1002

»

［１５］-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-が、

-NH-$(CH_2)_5$-C(=O)-、

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、又は

-NH-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(=O)-

である［１］から［１４］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0017] ［１６］薬物－リンカー構造部分が、次の薬物－リンカー構造の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１］から［１５］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH

-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

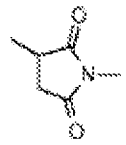
-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0018] ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

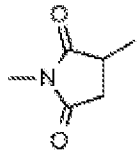
[化8]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[化9]

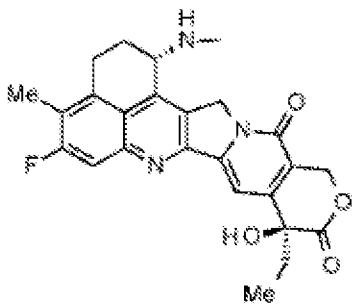


で示される構造であり、このものの３位でL^2と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

-(NH-DX)は次式：

[化10]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示し、

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のペプチド残基を示す。

[0019] ［１７］ $-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１］から[９]および[１１]から[１４]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

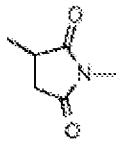
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

[0020] ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

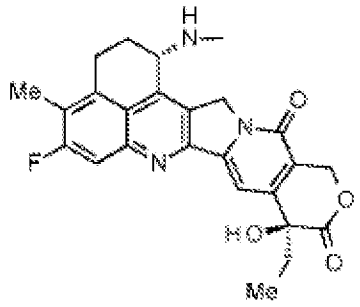
[化11]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(NH-DX)は次式：

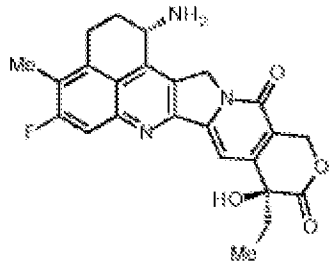
[化12]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

[0021] [１８] 次式

[化13]



で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

-L¹-L²-Lᵖ-NH-(CH₂)n¹-Lˢ-Lᵇ-Lᶜ-

で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体－薬物コンジュゲート。

ここで、抗体はL¹の末端において結合し、抗腫瘍性化合物はLᶜの末端において結合し、

式中、

n¹は、０から６の整数を示し、

L¹は、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH₂)n²-C(=O)-を示し、抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して抗体に結合するが、

ここで、n²は、２から８の整数を示し、

L²は、-NH-(CH₂-CH₂-O)n³-CH₂-CH₂-C(=O)-又は単結合を示し、

ここで、n³は、１から６の整数を示し、

Lᵖは、GGFGのテトラペプチド残基を示し、

Lˢは、-O-又は単結合を示し、

Lᵇは、-CR²(-R³)-又は単結合を示し、

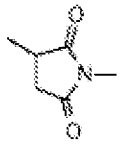
ここで、R²及びR³は水素原子を示し、

Lᶜは-C(=O)-を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

OnCusp
Ex. 1002

[化14]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

[0022] [１９] n^2が２であり、L^2が-NH-$(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)$-であって、$n^6$が２であり、$n^1$が３であり、$L^a$および$L^b$がいずれも単結合であるか、

n^2が５であり、L^2が単結合であり、n^1が１であり、L^aが-O-であり、 L^bが-C$R^2(-R^3)$-であるか、または

n^2が５であり、L^2が単結合であり、n^1が２であり、L^aが-O-であり、 L^bが-C$R^2(-R^3)$-である、［１８］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２０］n^2が、２から５の整数であって、L^2が、単結合である［１８］又は［１９］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２１］n^2が、２から５の整数であって、L^2が、-NH-$(CH_2CH_2O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)$-であり、$n^6$が、２又は４である［１８］又は［１９］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２２］-NH-$(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c$-が、

-NH-$(CH_2)_5-C(=O)$-、

-NH-$CH_2-O-CH_2-C(=O)$-、又は

-NH-$(CH_2)_2-O-CH_2-C(=O)$-

である［１８］から［２１］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0023] ［２３］薬物－リンカー構造部分が、次の薬物－リンカー構造の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１８］から[２２]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2-C(=O)$-GGFG-NH-$CH_2CH_2-C(=O)$-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2-C(=O)$-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2-C(=O)$-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

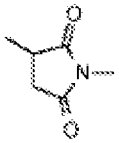
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

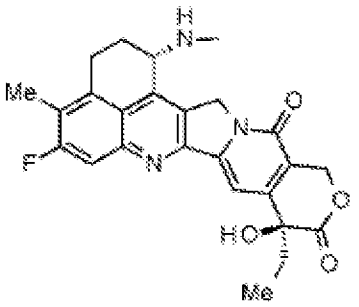
[化15]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(NH-DX)は次式：

[化16]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

[0024] [２４] -L^1-L^2-L^3-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^4-L^5-L^6-に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である[２３]に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

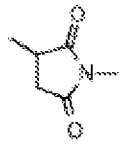
~(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

~(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

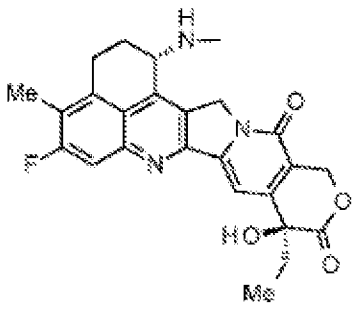
[化17]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(NH-DX)は次式：

[化18]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

[0025] ［２５］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である［１］から［２４］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２６］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である［１］から［２４］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２７］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である［１］から［２４］のいずれか一に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２８］抗体が、標的細胞を認識できる特性、標的細胞に結合できる特性、標的細胞に内在化できる特性、標的細胞を傷害する特性の一又はそれ以上の特性を備えた抗体である［１］から［２７］にいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２９］抗体－薬物コンジュゲートが標的とする細胞が腫瘍細胞である［１］から[２７]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３０］抗体が、抗Ａ３３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣａｎＡｇ抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ７０抗体、抗ＣＥＡ抗体、抗Ｃｒｉｐｔｏ抗体、抗ＥｐｈＡ２抗体、抗Ｇ２５０抗体、抗ＭＵＣ１抗体、抗ＧＰＮＭＢ抗体、抗Ｉｎｔｅｇｒｉｎ抗体、抗体ＰＳＭＡ抗体、抗Ｔｅｎａｓｃｉｎ－Ｃ抗体、抗ＳＬ

Ｃ４４Ａ４抗体、又は抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体である［１］から［２７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３１］抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、又は抗ＣＤ７０抗体である［１］から［２７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３２］抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体である［１］から［２７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0026] ［３３］［１］から［３２］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

［３４］［１］から［３２］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

［３５］肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、又は食道癌に適用するための［３４］に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

［３６］［１］から［３２］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

［３７］肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、又は食道癌に適用するための［３６］に記載の医薬組成物。

［３８］［１］から［３２］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

[0027] ［３９］次式で示される薬物－リンカー中間体化合物：

$Q\text{-}(CH_2)n^0\text{-}C(=O)\text{-}L^{2a}\text{-}L^p\text{-}NH\text{-}(CH_2)n^1\text{-}L^a\text{-}L^b\text{-}L^c\text{-}(NH\text{-}DX)$

[0028] 式中、Ｑは、(maleimid-N-yl)-、HS-、X-CH_2-C(=O)-NH-、又は(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-を示し、

Ｘは、臭素原子又はヨウ素原子を示し、

n^0は、整数の２から８を示し、

L^{2-8}は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^8-CH_2-CH_2-C(=O)-$、又は単結合を示し、

ここで、n^8は、１から６の整数を示し、

L^Pは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^Aは、$-C(=O)-NH-$、$-NR^1-(CH_2)n^7-$、$-O-$、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-COOH$、又は$-(CH_2)n^8-OH$を示すが、n^8は、整数の１から４を示し、n^8は、１から６の整数を示し、

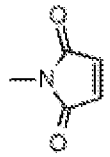
L^0は、$-CR^2(-R^3)-$、$-O-$、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-NH_2$、$-(CH_2)n^9-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$を示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^8は、０から６の整数を示し、n^9は、整数の１から４を示し、n^cは、整数の１から４を示すが、n^8が０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

L^cは、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

(maleimid-N-yl)-は、次式

[化19]

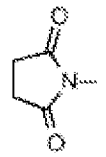


で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)は、次式

OnCusp
Ex. 1002

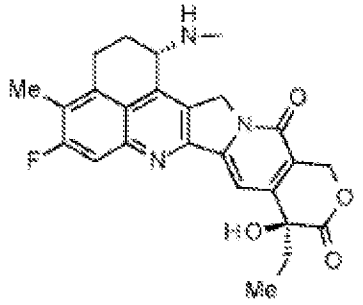
[化20]



で示される窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[化21]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0029] ［４０］L^cが-C(=O)-である［３９］に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４１］L^pが、４個のアミノ酸から構成されたペプチド残基である［３９］または［４０］に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４２］L^pが、-GGFG-である［３９］から［４１］のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４３］$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$が、

$-NH-CH_2CH_2-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、

$-NH-CH_2-O-CH_2-$、又は

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$である［３９］から［４２］のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４４］$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$が、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-$(CH_2)_2$-O-CH_2-である［３９］から［４２］のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４５］n^9が、整数の２から６である、［３９］から［４４］のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４６］Ｑが、(maleimid-N-yl)-であり、

n^9が、整数の２から５であり、

L^{2a}が単結合である［４３］に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４７］Ｑが、(maleimid-N-yl)-であり、

n^9が、整数の２から５であり、

L^{2a}が単結合である［４４］に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４８］Ｑが、(maleimid-N-yl)-であり、

n^9が、整数の２から５であり、

L^{2a}が-NH-$(CH_2$-CH_2-O$)n^8$-CH_2-CH_2-C(=O)-であり、

n^8が、整数の２から４であり、

-NH-$(CH_2)n^3$-L^a-L^b-が、

-NH-CH_2CH_2-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である［３９］から［４２］のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［４９］n^8が、整数の２又は４であり、

-NH-$(CH_2)n^3$-L^a-L^b-が、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である［４８］に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[0030] ［５０］次の化合物：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2C

H_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-

NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=

O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH

$_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH

$_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O

)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C

(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH

$_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH

$_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH

$_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=

O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C

(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH

$_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O

-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH

$_2$-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C

(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH

$_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O

-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

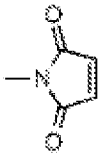
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、又は

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2

$CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

[0031] ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

[化22]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

Xはハロゲン原子を示し、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

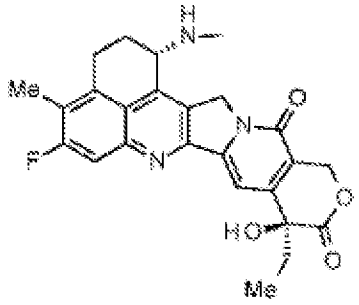
[化23]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[化24]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0032] ［５１］次の化合物：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

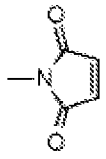
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、又は

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

[0033] ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

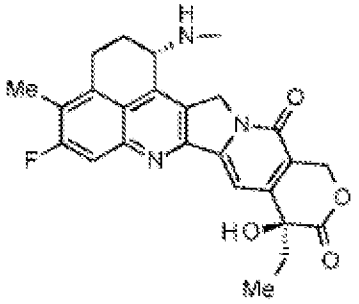
[化25]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり，

-(NH-DX)は、次式

[化26]



OnCusp
Ex. 1002

で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

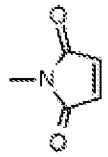
[0034] ［５２］次の化合物：(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)又は

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

[0035] ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

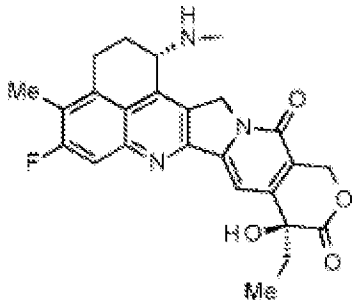
[化27]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[化28]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0036] ［５３］次の群から選ばれる化合物：

NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

NH_2-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

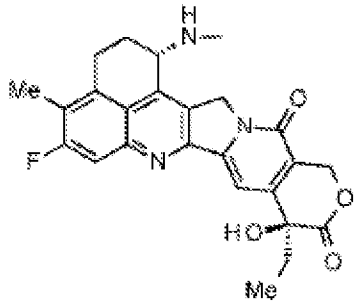
NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

NH_2-$CHCH_2$-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、及び

HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

式中、-(NH-DX)は、次式

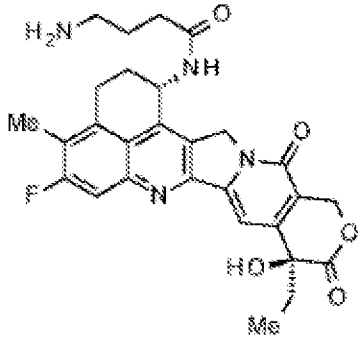
[化29]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0037] [５４] 次式

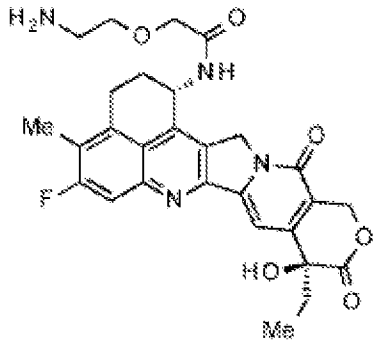
[化30]



で示される化合物。

[0038] [５５] 次式：

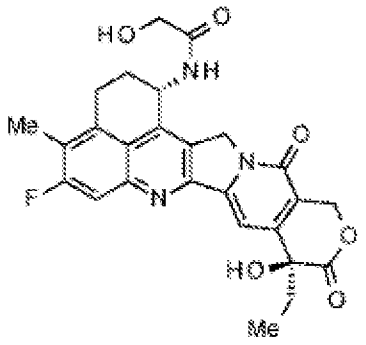
[化31]



で示される化合物。

[0039] [５６] 次式

[化32]



で示される化合物。

[0040] [５７] 次式で示される化合物：

$Q-(CH_2)n^0-C(=O)-L^{2a}-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

を抗体又はその反応性誘導体と反応させ、

抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させる方法、又は

抗体を構成するアミノ酸の側鎖上に存在するアミノ基または末端のアミノ基においてアミド結合を形成させる方法

によって薬物－リンカー部分を抗体に結合させることを特徴とする抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

[0041] 式中、Ｑは、(maleimid-N-yl)-、HS-、$X-CH_2-C(=O)-NH-$、又は

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-を示し、

Ｘは、臭素原子又はヨウ素原子を示し、

n^0は、整数の２から８を示し、

L^{2a}は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$、又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、

L^Pは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^aは、$-C(=O)-NH-$、$-NR^3-(CH_2)n^2-$、$-O-$、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-COOH$、又は$-(CH_2)n^9-OH$を示すが、n^8は、整数の１から４を示し、n^9は、１から６の整数を示し、

L^5は、$-CR^2(-R^3)-$、$-O-$、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^5-NH_2$、$-(CH_2)n^6-COOH$、又は$-(CH_2)n^7-OH$を示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^5は、０から６の整数を示し、n^6は、整数の１から４を示し、n^7は、整数の１から４を示すが、n^5が０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

L^6は、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

(maleimid-N-yl)-は、次式

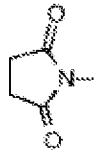
[化33]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)は、次式

[化34]

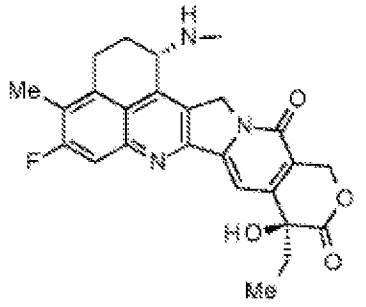


で示される窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

OnCusp
Ex. 1002

[化35]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0042] [５８]薬物－リンカー部分を抗体に結合させる方法が、

抗体を還元処理した後に、Ｑが、マレイミジル基又はX-CH_2-C(=O)-NH-である化合物を反応させてチオエーテル結合を形成させる方法、

抗体に、Ｑが、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-である化合物を反応させてアミド結合を形成させる方法、又は

抗体に式Q^1-L^{1a}-Q^2

[式中、Q^1は、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-、(3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-、R^Q-O-C(=N)-、又はO=C=N-を示し、

L^{1a}-は、-cyc.Hex(1,4)-CH_2-、炭素数１から１０のアルキレン基、フェニレン基、-$(CH_2)n^4$-C(=O)-、-$(CH_2)n^{4a}$-NH-C(=O)-$(CH_2)n^{4b}$-、又は-$(CH_2)n^{4a}$-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-を示し、

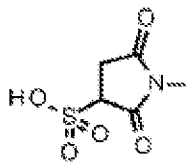
Q^2は、(maleimid-N-yl)、ハロゲン原子、又は-S-S-(2-Pyridyl)を示し、

R^Qは、炭素数１から６のアルキル基、n^4は、１から８の整数を示し、

n^{4a}は０から６の整数、n^{4b}は１から６の整数を示し、

(3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

[0043] [化36]



[0044] で示される窒素原子が結合部位である基であり、このスルホン酸はリチウム

OnCusp
Ex. 1002

塩、ナトリウム塩、カリウム塩を形成でき、

cyc.Hex(1,4)は１，４−シクロヘキシレン基を示し、

(2-Pyridyl)は、２−ピリジル基を示す。］

で示される化合物を反応させた後に、Ｑが、ＳＨである化合物を反応させてアミド結合によって薬物−リンカー構造を形成させる方法、

のいずれかである［５７］に記載の製造方法。

[0045] ［５９］選択された１種の薬物−リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である［５７］又は［５８］に記載の製造方法。

［６０］選択された１種の薬物−リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である［５７］又は［５８］に記載の製造方法。

［６１］選択された１種の薬物−リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である［５７］又は［５８］に記載の製造方法。

［６２］抗体−薬物コンジュゲートが標的とする細胞が腫瘍細胞である［５７］から[６１]のいずれか一項に記載の製造方法。

［６３］抗体が、抗Ａ３３抗体、抗Ｂ７−Ｈ３抗体、抗ＣａｎＡｇ抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ７０抗体、抗ＣＥＡ抗体、抗Ｃｒｉｐｔｏ抗体、抗ＥｐｈＡ２抗体、抗Ｇ２５０抗体、抗ＭＵＣ１抗体、抗ＧＰＮＭＢ抗体、抗Ｉｎｔｅｇｒｉｎ抗体、抗体ＰＳＭＡ抗体、抗Ｔｅｎａｓｃｉｎ−Ｃ抗体、抗ＳＬＣ４４Ａ４抗体、又は抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体である［５７］から[６１]のいずれか一項に記載の製造方法。

［６４］抗体が、抗Ｂ７−Ｈ３抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、又は抗ＣＤ７０抗体である［５７］から[６１]のいずれか一項に記載の製造方法。

［６５］抗体が、抗Ｂ７−Ｈ３抗体である［５７］から[６１]のいずれか一項に記載の製造方法。

［６６］［５７］から［６５］のいずれかの製造方法によって得られる抗体−薬物コンジュゲート。

〔0046〕〔６７〕抗体を還元条件で処理した後に以下の化合物群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、抗体のヒンジ部のスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体－薬物コンジュゲート：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2C

H_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-

NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、又は

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

[0047] ここで、(maleimid-N-yl)-は、次式

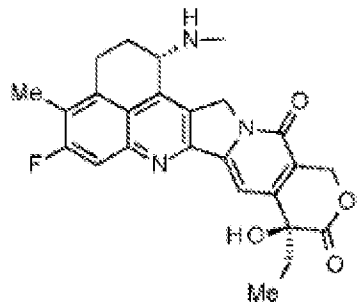
[化37]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[化38]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0048] [６８]抗体を還元条件で処理した後に以下の化合物群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、抗体のヒンジ部のスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体－薬物コンジュゲート：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

又は

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

。

ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

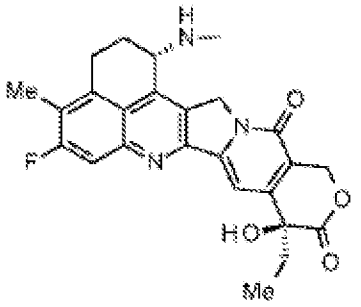
[化39]



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[化40]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0049] ［６９］選択された１種の薬物－リンカー構造をの１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である［６７］又は［６８］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７０］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である［６７］又は［６８］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７１］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である［６７］又は［６８］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７２］抗体－薬物コンジュゲートが標的とする細胞が腫瘍細胞である［６７］から[７１]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７３］抗体が、抗Ａ３３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣａｎＡｇ抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ７０抗体、抗ＣＥＡ抗体、抗Ｃｒｉｐｔｏ抗体、抗ＥｐｈＡ２抗体、抗Ｇ２５０抗体、抗ＭＵＣ１抗体、抗ＧＰＮＭＢ抗体、抗Ｉｎｔｅｇｒｉｎ抗体、抗体ＰＳＭＡ抗体、抗Ｔｅｎａｓｃｉｎ－Ｃ抗体、抗ＳＬＣ４４Ａ４抗体、又は抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体である［６７］から[７１]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７４］抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、又は抗ＣＤ７０抗体である［６７］から[７１]のいずれか一項に記載の抗体－

薬物コンジュゲート。

［７５］抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体である［６７］から［７１］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0050] ［７６］リンカーを介して薬物と抗体とが結合された抗体－薬物コンジュゲートを得るための次式で示されるリンカー。

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

ここで、L^1は抗体への結合部位であり、L^cは抗腫瘍性化合物への結合部位であり、

式中、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、$-CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-を示し、

ここで、n^2は、２から８の整数を示し、n^3は、１から８の整数を示し、n^4は、１から８の整数を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2$-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-、-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、n^6は、１から６の整数を示し、

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^aは、-C(=O)-NH-、$-NR^1-(CH_2)n^7$-、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8$-COOH、又は$-(CH_2)n^8$-OHを示すが、n^8は、整数の１から４を示し、n^8は、１から６の整数を示し、

L^bは、$-CR^2(-R^3)$-、-O-、$-NR^4$-、又は単結合を示し、

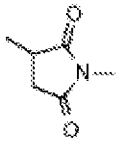
ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^9$-NH_2、$-(CH_2)n^9$-COOH、又は$-(CH_2)n^9$-OHを示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^9は、０から６の整数を示し、n^bは、整数の１から４を示し、n^cは、整数の１から４を示すが、n^bが０である

ときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

L^6は、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

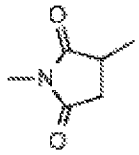
[化41]



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[化42]



で示される構造であり、このものの３位でL^9と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

L^2が$-S-(CH_2)n^8-C(=O)-$のとき、L^1は$-C(=O)-$cyc.Hex(1,4)$-CH_2-$(N-ly-3-diminiccuS)-となる。

〔0051〕［７７］次の群から選ばれる［７６］に記載のリンカー、ただし左端が抗体との結合部位であり、右端が抗腫瘍性化合物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-

GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

~(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

~(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH

$_2CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGF$

$G-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-$

$C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH$

$_2CH_2CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGF$

$G-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-$

$C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH$

$_2-O-CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGF$

$G-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-C$

$H_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH$

$_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGF$

$G-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG

-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

［７８］次の群から選ばれる［７６］に記載のリンカー、ただし左端が抗体との結合部位であり、右端が抗腫瘍性化合物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

［７９］次の群から選ばれる［７６］に記載のリンカー、ただし左端が抗体との結合部位であり、右端が抗腫瘍性化合物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

［８０］次の群から選ばれる［７６］に記載のリンカーリンカー、ただし左端が抗体との結合部位であり、右端が抗腫瘍性化合物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

発明の効果

[0052] 特定の構造のリンカーを介して抗腫瘍性化合物エキサテカンを結合させた抗体－薬物コンジュゲートによって優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することができる。

図面の簡単な説明

[0053] [図1]図１は、Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列（配列番号１）を示す。

[図2]図２は、Ｂ７－Ｈ３バリアント２のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

[図3]図３は、Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号９）を示す。

[図4]図４は、Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。

[図5]図５は、Ｍ３０－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号１１）を示す。

[図6]図６は、Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号１２）を示す。

[図7]図７は，Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１３）を示す。

[図8]図８は、Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１４）を示す。

[図9]図９は，Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１５）を示す。

[図10]図１０は、Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１６）を示す。

[図11]図１１は、Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１７）を示す。

[図12]図１２は、Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１８）を示す。

[図13]図１３は、Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号１９）を示す。

[図14]図１４は、Ｍ３０抗体重鎖のアミノ酸配列（配列番号２０）を示す。

[図15]図１５は、Ｍ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号２１）を示す。

[図16]図１６は、Ｂ７－Ｈ３バリアント１のヌクレオチド配列（配列番号２６）を示す。

[図17]図１７は、皮下移植したヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞への抗体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、白三角線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。

[図18]図１８は、皮下移植したヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞への抗体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。白ひし形線は無処置の腫瘍、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（２）０．１ｍｇ／ｋｇ投与時、線－Ｘ－は０．３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒三角線は１ｍｇ／ｋｇ投与時、白丸線は３ｍｇ／ｋｇ投与時の効果を示す。

[図19]図１９は、皮下移植したヒト非小細胞肺癌株Ｃａｌｕ－６細胞への抗

体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。白ひし形線は無処置の腫瘍、白三角線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。

[図20]図２０は、皮下移植したヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞胞への抗体－薬物コンジュゲート（１）、（１３）、（４１）、（５５）の効果を示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（１）、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１３）、線－Ｘ－は抗体－薬物コンジュゲート（４１）、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（５５）の効果を示す。

[図21]図２１は、皮下移植したヒト非小細胞肺癌株Ｃａｌｕ－６細胞への抗体－薬物コンジュゲート（１３）、（４１）、（５５）の効果を示す。白ひし形線は無処置の腫瘍、白丸線はDE-310、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１３）、線－Ｘ－は抗体－薬物コンジュゲート（４１）、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（５５）の効果を示す。

[図22]図２２は、皮下移植したヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞への抗体－薬物コンジュゲート（１７）、（１８）、（１９）、（５９）、（６０）、（６１）の効果を示す。図黒ひし形線は無処置の腫瘍、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１７）、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１８）、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）、黒三角線は抗体－薬物コンジュゲート（５９）、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（６０）、線－Ｘ－は抗体－薬物コンジュゲート（６１）の効果を示す。

発明を実施するための形態

[0054] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、抗腫瘍性抗体に、リンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させた抗腫瘍性薬物であり、以下に詳細に説明する。

[0055] [抗体]

本発明の抗体－薬物コンジュゲートに使用される抗体は、免疫グロブリンを意味し、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子である

OnCusp
Ex. 1002

。本発明の抗体として、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgYのいずれのクラスでもよいが、IgGが好ましい。また、サブクラスとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2のいずれであってもよいがIgG1及びIgG2が好ましい。抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウス及びウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明の抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であればよい。すなわち抗腫瘍活性を有する薬物をリンカーを介して結合させることから、抗体としては、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性、さらには腫瘍細胞を障害する特性の一又はそれ以上の特性を備えていることが好ましい。

抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、（１）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761）、（２）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）又は（３）治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab-ZAPアッセイ（BioTechniques 28:162-165 ,January 2000)を用いて確認できる。

抗体の抗腫瘍活性は、腫瘍細胞への細胞障害活性、殺細胞効果をいうが、ｉｎ ｖｉｔｒｏでは、細胞の増殖の抑制活性で測定することで確認できる。例えば、抗体の標的蛋白質を過剰発現している癌細胞株を培養し、培養系に種々の濃度で抗体を添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。Ｉｎ ｖｉｖｏでは、

例えば、標的蛋白質を高発現している腫瘍細胞株を移植したヌードマウスに抗体を投与し、癌細胞の変化を測定することによって、抗腫瘍活性を確認できる。なお、抗体－薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する薬物を結合させてあるので、抗体自体に抗腫瘍効果があることは必須ではないが抗腫瘍効果を有することがより好ましい。抗腫瘍効果の発揮の点からは抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質のあることが、薬物によって腫瘍細胞を特異的・選択的に障害を与える点で重要であり、好ましい。

このような抗体として、抗Ａ３３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣａｎＡｇ抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ７０抗体、抗ＣＥＡ抗体、抗Ｃｒｉｐｔｏ抗体、抗ＥｐｈＡ２抗体、抗Ｇ２５０抗体、抗ＭＵＣ１抗体、抗ＧＰＮＭＢ抗体、抗Ｉｎｔｅｇｒｉｎ抗体、抗体ＰＳＭＡ抗体、抗Ｔｅｎａｓｃｉｎ－Ｃ抗体、抗ＳＬＣ４４Ａ４抗体、抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体を例示できるがこれに限らない。

本発明の抗体として、好ましくは、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ７０抗体及び抗Ｂ７－Ｈ３抗体であり、さらに好ましくは抗Ｂ７－Ｈ３抗体である。

[0056] 本発明の抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein,Nature(1975)256,p.495-497、Kennet,R.ed.,Monoclonal Antibodies,p.365-367,Plenum Press,N.Y.(1980)）に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。

抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ７０抗体は、それぞれ、ＷＯ２００２／０４３６６１、米国特許第５，７７３，００１号、ＷＯ２００６／１１３９０９に基づき、公知の手段によって取得することができる。

[0057] 本発明において使用されるＢ７－Ｈ３抗体としては、以下の特性を有する抗体が望ましい。

（１）以下の特性を有することを特徴とする抗体；

（ａ）Ｂ７－Ｈ３に特異的に結合する

（ｂ）抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）活性を有する

（ｃ）ｉｎ　ｖｉｖｏで抗腫瘍活性を有する

（２）Ｂ７－Ｈ３が配列番号１又は２に記載のアミノ酸配列からなる分子である上記（１）に記載の抗体又は当該抗体。

（３）重鎖における相補性決定領域として配列番号３に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２及び配列番号５に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３、並びに軽鎖における相補性決定領域として配列番号６に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号７に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２及び配列番号８に記載のアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３を有する上記（１）又は（２）に記載の抗体。

（４）定常領域がヒト由来定常領域である上記（１）乃至（３）のいずれかに記載の抗体。

（５）ヒト化されている上記（１）乃至（４）のいずれかに記載の抗体。

（６）（ａ）配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｂ）配列番号１０においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｃ）配列番号１１においてアミノ酸番号２０乃至１４１

に記載のアミノ酸配列、（ｄ）配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列、（ｅ）（ａ）乃至（ｄ）の配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（ｆ）（ａ）乃至（ｄ）の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域、並びに（ｇ）配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｈ）配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｉ）配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｊ）配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｋ）配列番号１７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｌ）配列番号１８においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｍ）配列番号１９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列、（ｎ）（ｇ）乃至（ｍ）の配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（ｏ）（ｇ）乃至（ｍ）の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、を有する上記（５）に記載の抗体。

（７）配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９においてアミ

OnCusp
Ex. 1002

ノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１８においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、並びに配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域からなる群から選択される重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を有する上記（６）に記載の抗体。

（８）配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ

酸配列からなる重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１７においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１８においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１９においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖からなる上記（６）又は（７）に記載の抗体。

（９）配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１８に記載のアミノ酸配列

OnCusp
Ex. 1002

からなる軽鎖、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖からなる上記（１４）乃至（１６）のいずれかに記載の抗体。

（１０）重鎖が配列番号９又は１２に記載のアミノ酸配列においてカルボキシル末端のアミノ酸が欠失している重鎖である上記（８）又は（９）に記載の抗体。

（１１）上記（１）乃至（１０）のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養する工程及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含む当該抗体の製造方法によって得られる抗体。

（１２）抗体依存性細胞傷害活性を増強させるために糖鎖修飾が調節されている上記（１）乃至（１１）のいずれかに記載の抗体。

[0058] 以下に、本発明において使用されるＢ７－Ｈ３抗体について説明する。

本明細書中において、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

本明細書中において、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずそのｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ及びそのｃＲＮＡも含まれる。

本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。

本明細中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含ん

OnCusp
Ex. 1002

でいる。

本明細書中において、「Ｂ７－Ｈ３」は、Ｂ７－Ｈ３蛋白質と同じ意味で用いており、また、Ｂ７－Ｈ３バリアント１及び／又はＢ７－Ｈ３バリアント２を意味する。

本明細書における「ＣＤＲ」とは、相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｒｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ３箇所のＣＤＲがあることが知られている。ＣＤＲは、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ　ｄｏｍａｉｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のＣＤＲについて、重鎖のＣＤＲを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖のＣＤＲを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（クロンテック社製）中、６８℃でハイブリダイズすること、又は、ＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７－１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１－２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭ　クエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

〔0059〕１．Ｂ７－Ｈ３

Ｂ７－Ｈ３は、抗原提示細胞に補助刺激分子として発現するＢ７ファミリーのひとつであり、Ｔ細胞上のレセプターに作用して免疫作用を促進又は抑

OnCusp
Ex. 1002

制すると考えられている。

Ｂ７－Ｈ３は１回膜貫通構造を有する蛋白質であるが、Ｂ７－Ｈ３のＮ末端側の細胞外領域には２つのバリアントが存在する。Ｂ７－Ｈ３バリアント１（４Ｉｇ－Ｂ７－Ｈ３）には各２ヶ所のＶ又はＣ様Ｉｇドメインが存在し、Ｂ７－Ｈ３バリアント２（２Ｉｇ－Ｂ７－Ｈ３）には各１ヶ所のＶ又はＣ様Ｉｇドメインが存在する。

本発明で用いるＢ７－Ｈ３は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス等）のＢ７－Ｈ３発現細胞から直接精製して使用するか、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、Ｂ７－Ｈ３をｉｎ　ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、Ｂ７－Ｈ３ｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＢ７－Ｈ３を発現させることによって、該蛋白質を得ることが出来る。

ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）のアミノ酸配列は配列表の配列番号１に記載されている。また、配列番号１の配列は図１に記載されている。

ヒトＢ７－Ｈ３バリアント２遺伝子のＯＲＦのアミノ酸配列は配列表の配列番号２に記載されている。また、配列番号２の配列は図２に記載されている。

また、上記各Ｂ７－Ｈ３のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、当該蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質もＢ７－Ｈ３に含まれる。

シグナル配列が除かれた成熟ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１は、配列番号１に示されるアミノ酸配列の２７番目から５３４番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。また、シグナル配列が除かれた成熟ヒトＢ７－Ｈ３バリアント２は、配列番号２に示されるアミノ酸配列の２７番目から３１

６番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。

〔0060〕２．抗Ｂ７－Ｈ３抗体の製造

本発明のＢ７－Ｈ３に対する抗体は、常法を用いて、Ｂ７－Ｈ３又はＢ７－Ｈ３のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるＢ７－Ｈ３の生物種はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するＢ７－Ｈ３を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種Ｂ７－Ｈ３に結合する抗体とヒトＢ７－Ｈ３との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

また、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ，Ｒ．ｅｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｐ．３６５－３６７，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、Ｂ７－Ｈ３に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

なお、抗原となるＢ７－Ｈ３はＢ７－Ｈ３遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に発現させることによって得ることができる。

具体的には、Ｂ７－Ｈ３遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したＢ７－Ｈ３を精製すればよい。以下、具体的にＢ７－Ｈ３に対する抗体の取得方法を説明する。

〔0061〕（１） 抗原の調製

抗Ｂ７－Ｈ３抗体を作製するための抗原としては、Ｂ７－Ｈ３又はその少なくとも６個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

Ｂ７－Ｈ３は、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、Ｂ７－Ｈ３をｉｎ ｖｉｔｒｏにて合成する、あるい

は遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

遺伝子操作では、具体的には、Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＢ７－Ｈ３を発現させることによって、抗原を得ることができる。

また、膜蛋白質であるＢ７－Ｈ３の細胞外領域と抗体の定常領域とを連結した融合蛋白質を適切な宿主・ベクター系において発現させることによって、分泌蛋白質として抗原を得ることも可能である。

Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡは例えば、Ｂ７－Ｈ３のｃＤＮＡを発現しているｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｂ７－Ｈ３　ｃＤＮＡを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「ＰＣＲ」という）（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．　Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２３９，ｐ．４８７－４８９　参照）を行なう、いわゆるＰＣＲ法によって取得することができる。

ポリペプチドのイン・ビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム（ＲＴＳ）を挙げることができるが、これに限定されない。

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）や枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）等を挙げることができる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ

OnCusp
Ex. 1002

，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞．ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ． ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）等がよく用いられているが、これらに限定されない。

上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養によって細胞内、又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、大腸菌であれば、例えば、ＬＢ培地に必要に応じて、アンピシリン等の抗生物質やＩＰＭＧを添加して用いることができる。

上記培養によって、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によって分離・精製することができる。

該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

また、発現させる組換え蛋白質に６残基からなるヒスチジンタグを繋げることによって、ニッケルアフィニティーカラムで効率的に精製することができる。あるいは、発現させる組換え蛋白質にＩｇＧのＦｃ領域を繋げることによって、プロテインＡカラムで効率的に精製することができる。

上記方法を組合せることによって容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

[0062] （２） 抗Ｂ７－Ｈ３モノクローナル抗体の製造

OnCusp
Ex. 1002

Ｂ７－Ｈ３と特異的に結合する抗体の例として、Ｂ７－Ｈ３と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。

すなわち、

（ａ）抗原として使用する生体高分子の精製、

（ｂ）抗原を動物に注射することによって免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、

（ｃ）骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、

（ｄ）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、

（ｅ）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、

（ｆ）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、

（ｇ）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、

（ｈ）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定

等である。

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

[0063] （ａ）抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製したＢ７－Ｈ３又はその一部を使用することができる。

また、Ｂ７－Ｈ３発現組換え体細胞よって調製した膜画分、又はＢ７－Ｈ３発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

OnCusp
Ex. 1002

〔0064〕 （ｂ）抗体産生細胞の調製

工程（ａ）で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、例えばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

また、実際に使用するマウス及びラットの系統には特に制限はなく、マウスの場合には、例えば各系統Ａ、ＡＫＲ、ＢＡＬＢ／ｃ、ＢＤＰ、ＢＡ、ＣＥ、Ｃ３Ｈ、５７ＢＬ、Ｃ５７ＢＬ、Ｃ５７Ｌ、ＤＢＡ、ＦＬ、ＨＴＨ、ＨＴ１、ＬＰ、ＮＺＢ、ＮＺＷ、ＲＦ、Ｒ ＩＩＩ、ＳＪＬ、ＳＷＲ、ＷＢ、１２９等が、またラットの場合には、例えば、Ｗｉｓｔａｒ、Ｌｏｗ、Ｌｅｗｉｓ、Ｓｐｒａｇｕｅ、Ｄａｗｌｅｙ、ＡＣＩ、ＢＮ、Ｆｉｓｃｈｅｒ等を用いることができる。

これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー、等実験動物飼育販売業者より入手することができる。

このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスではＢＡＬＢ／ｃ系統が、ラットではＷｉｓｔａｒ及びＬｏｗ系統が被免疫動物として特に好ましい。

また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ましい。

なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは５～１２週齢、さらに好ましくは６～８週齢である。

Ｂ７－Ｈ３又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Ｗｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．Ｉ．ＩＩ．ＩＩＩ．，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ

Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９８７）、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ａｎｄ Ｍａｙｅｒ，Ｍ．Ｍ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｃｈａｒｌｅｓ Ｃ Ｔｈｏｍａｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ Ｓｐｒｉｎｇｆｉｅｌｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ（１９６４）等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。

これらの免疫法のうち、本発明において好適な方法を具体的に示せば、例えば以下のとおりである。

すなわち、まず、抗原である蛋白質画分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。

ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。

抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等によって異なるが、一般には、抗原投与回数３～６回、投与間隔２～６週間が好ましく、投与回数３～４回、投与間隔２～４週間がさらに好ましい。

また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等によって異なるが、一般には０．０５～５ｍｇ、好ましくは０．１～０．５ｍｇ程度とする。

追加免疫は、以上の通りの抗原投与の１～６週間後、好ましくは２～４週間後、さらに好ましくは２～３週間後に行う。

なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等によって異なるが、一般に、例えばマウスの場合には０．０５～５ｍｇ、好ましくは０．１～０．５ｍｇ、さらに好ましくは０．１～０．２ｍｇ程度とする。

上記追加免疫から１～１０日後、好ましくは２～５日後、さらに好ましくは２～３日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、ＲＩＡ法又はＥＬＩＳＡ法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

本発明における抗体価の測定は、例えばＥＬＩＳＡ法によれば、以下に記載するような手順によって行うことができる。

まず、精製又は部分精製した抗原をＥＬＩＳＡ用９６穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン（以下「ＢＳＡ」という）によって覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することによって、抗体価を算出する。

被免疫動物の脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５，；Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９７７）６，ｐ．５１１，；Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７７），２６６，ｐ．５５０，；Ｗａｌｓｈ，Ｎａｔｕｒｅ，（１９７７）２６６，ｐ．４９５）に従って行うことができる。例えば、脾臓細胞の場合には、脾臓を細切して細胞をステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地（ＭＥＭ）に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的方法を採用することができる。

〔0065〕 （ｃ）骨髄腫細胞（以下、「ミエローマ」という）の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているＨＧＰＲＴ（Ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ－ｇｕａｎｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｌ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）欠損株を用いるのが好ましい。

すなわち、マウス由来のＸ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）、ＮＳ１－ＡＮＳ／１

（ＮＳ１）、Ｐ３Ｘ６３－Ａｇ８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３（Ｘ６３．６５３）、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ２／０）、ＭＰＣ１１－４５．６ＴＧ１．７（４５．６ＴＧ）、ＦＯ、Ｓ１４９／５ＸＸＯ、ＢＵ．１等、ラット由来の２１０．ＲＳＹ３．Ａｇ．１．２．３（Ｙ３）等、ヒト由来のＵ２６６ＡＲ（ＳＫＯ－００７）、ＧＭ１５００・ＧＴＧ－Ａ１２（ＧＭ１５００）、ＵＣ７２９－６、ＬＩＣＲ－ＬＯＷ－ＨＭｙ２（ＨＭｙ２）、８２２６ＡＲ／ＮＩＰ４－１（ＮＰ４１）等である。これらのＨＧＰＲＴ欠損株は例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）等から入手することができる。

これらの細胞株は、適当な培地、例えば８－アザグアニン培地［ＲＰＭＩ－１６４０培地にグルタミン、２－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清（以下「ＦＢＳ」という）を加えた培地に８－アザグアニンを加えた培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＩＭＤＭ」という）、又はダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＤＭＥＭ」という）で継代培養するが、細胞融合の３乃至４日前に正常培地［例えば、１０％ ＦＣＳを含むＡＳＦ１０４培地（味の素（株）社製）］で継代培養し、融合当日に2×10^7以上の細胞数を確保しておく。

[0066] （ｄ）細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法（Ｗｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．Ｉ．ＩＩ．ＩＩＩ．，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９８７）、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ａｎｄ Ｍａｙｅｒ，Ｍ．Ｍ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｃｈａｒｌｅｓ Ｃ Ｔｈｏｍａｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ Ｓｐｒｉｎｇｆｉｅｌｄ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ（１９６４）等）に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実

施することができる。

そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。

すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量１５００～６０００、好ましくは２０００～４０００のポリエチレングリコール溶液中で、３０～４０℃、好ましくは３５～３８℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを１～１０分間、好ましくは５～８分間混合する。

[0067] （ｅ）ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合によって得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常ＨＡＴ（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法（Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７５）２５６，ｐ．４９５；Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９７７）２６６，ｐ．５５０）が用いられる。

この方法は、アミノプテリンで生存し得ないＨＧＰＲＴ欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。

すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをＨＡＴ培地で培養することによって、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

[0068] （ｆ）単一細胞クローンへの分割（クローニング）

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる（例えばＢａｒｂａｒａ， Ｂ．Ｍ．ａｎｄ Ｓｔａｎｌｅｙ，Ｍ．Ｓ．：Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ（１９８０）参照）。これらの方法のうち、特にメチルセルロー

ス法等の三次元培養法が好適である。例えば、細胞融合によって形成されたハイブリドーマ群をＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ Ｄ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製 ＃０３８０４）等のメチルセルロース培地に懸濁して培養し、形成されたハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローンハイブリドーマの取得が可能である。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清中に安定して抗体価の認められたものをＢ７－Ｈ３モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

[0069] このようにして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、Ｂ７－Ｈ３ハイブリドーマＭ３０を挙げることができる。なお、本明細書中においては、Ｂ７－Ｈ３ハイブリドーマＭ３０が産生する抗体を、「Ｍ３０抗体」又は単に「Ｍ３０」と記載する。

Ｍ３０抗体の重鎖は、配列表の配列番号２０に示されるアミノ酸配列を有する。また、Ｍ３０抗体の軽鎖は、配列表の配列番号２１に示されるアミノ酸配列を有する。なお、配列表の配列番号２０に示される重鎖アミノ酸配列中で、１乃至１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２乃至４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。また、配列表の配列番号２１に示される軽鎖アミノ酸配列中で、１乃至２２番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２３乃至１３０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１３１乃至２３５番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。

[0070] （ｇ）ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することによって、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。

このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

本発明における抗体価の測定は、例えば上記（ｂ）の項目で説明したＥＬＩＳＡ法によって行うことができる。

以上の方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は－８０℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をＨＴ培地から正常培地に換えて培養される。

大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清から、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することによって、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

また、同系統のマウス（例えば、上記のＢＡＬＢ／ｃ）、あるいはＮｕ／Ｎｕマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることによって、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

腹腔内に投与する場合には、事前（３～７日前）に２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（２，６，１０，１４－ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｐｅｎｔａｄｅｃａｎｅ）（プリスタン）等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

例えば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、Ｔ細胞を不活性化した後、２０日後に10^6～10^7個のハイブリドーマ・クローン細胞を、血清を含まない培地中に浮遊（０．５ｍｌ）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水がたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法によって、培養液中に比べて約１００倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

上記方法によって得たモノクローナル抗体は、例えばＷｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．：Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．Ｉ，ＩＩ，ＩＩＩ，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆ

ｉｃ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９７８）に記載されている方法で精製することができる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、Ｂ７－Ｈ３に対して高い抗原特異性を有する。

[0071] （ｈ）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。

まず、同定法としてはオクテルロニー（Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ）法、ＥＬＩＳＡ法、又はＲＩＡ法を挙げることができる。

オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

一方、ＥＬＩＳＡ法又はＲＩＡ法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることによって、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び２８０ｎｍにおける吸光度［１．４（ＯＤ２８０）＝イムノグロブリン１ｍｇ／ｍｌ］より算出する方法によって行うことができる。

さらに、（２）の（ａ）乃至（ｈ）の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合においても、Ｍ３０抗体と同等の細胞傷害活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、Ｍ３０抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。Ｍ３０はＢ７－Ｈ３の細胞外領域中のドメインであるＩｇＣ１ドメイン又はＩｇＣ２ドメインにおけるエピトープを認識して、ＩｇＣ１ドメイン若しくはＩｇＣ２ドメイン又は両者に結合するので、特に当該エピトープとしてはＢ７－Ｈ３のＩｇＣ１ドメイン又はＩｇＣ２ドメインに存在するエピトー

ブを挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、Ｍ３０抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体が、Ｍ３０抗体とＢ７－Ｈ３の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体がＭ３０抗体と同等の細胞傷害活性を有していることが強く期待される。

[0072] （３） その他の抗体

本発明の抗体には、上記Ｂ７－Ｈ３に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ）抗体、ヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体、ヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，６８５１－６８５５，（１９８４）参照）。

ヒト化抗体としては、相補性決定領域（ＣＤＲ；ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照）、ＣＤＲ移植法によって、ＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開パンフレットＷＯ９０／０７８６１）を挙げることができる。

但し、Ｍ３０抗体由来のヒト化抗体としては、Ｍ３０抗体の６種全てのＣＤＲ配列を保持し、抗腫瘍活性を有する限り、特定のヒト化抗体に限定され

ない。なお、Ｍ３０抗体の重鎖可変領域は、配列表の配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＮＹＶＭＨ）、配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＹＩＮＰＹＮＤＤＶＫＹＮＥＫＦＫＧ）、及び配列番号５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＷＧＹＹＧＳＰＬＹＹＦＤＹ）を保有している。また、Ｍ３０抗体の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＡＳＳＲＬＩＹＭＨ）、配列番号７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＡＴＳＮＬＡＳ）、及び配列番号８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＱＱＷＮＳＮＰＰＴ）を保有している。

[0073] マウス抗体Ｍ３０のヒト化抗体の実例としては、（１）配列表の配列番号９、１０、１１又は１２の２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、（２）上記（１）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（３）上記（１）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列のいずれか一つからなる重鎖可変領域を含む重鎖、並びに（４）配列番号１３、１４、１５、１６、１７、１８又は１９の２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、（５）上記（４）のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び（６）上記（４）のアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列のいずれか一つからなる軽鎖可変領域を含む軽鎖の任意の組合せを挙げることができる。

なお、本明細書中における「数個」とは、１乃至１０個、１乃至９個、１乃至８個、１乃至７個、１乃至６個、１乃至５個、１乃至４個、１乃至３個、又は１若しくは２個を意味する。

[0074] また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リシ

ン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び非荷電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

上記重鎖及び軽鎖の好適な組合せの抗体としては、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１７においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１８においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領

域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１９においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体、並びに配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至１４１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を有する重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至１２８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0075] さらに好適な組合せの抗体としては、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載目のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミ

ノ酸番号２０乃至４７１に記載目のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１７においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１８においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１９においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３においてアミノ酸番号２１乃至２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４においてアミノ酸番号２１乃至２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、並びに配列番号１２においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体。

[0076] また、別の好適な組合せとしては、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１７に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号９に記載のアミ

ノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１９に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１５に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、並びに配列番号１２に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0077] 上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い相同性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の細胞傷害性活性を有する抗体を選択することが可能である。このような相同性は、一般的には８０％以上の相同性であり、好ましくは９０％以上の相同性であり、より好ましくは９５％以上の相同性であり、最も好ましくは９９％以上の相同性である。また、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に１乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の細胞傷害性活性を有する抗体を選択することが可能である。

[0078] 二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．２．２（Ａｌｔｓｃｈｕｌ， Ｓｔｅｐｈｅｎ Ｆ．，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，Ａｌｅｊａｎｄｒｏ Ａ．Ｓｃｈａｆｆｅｒ，Ｊｉｎｇｈｕｉ Ｚｈａｎｇ，Ｚｈｅｎｇ Ｚｈａｎｇ，Ｗｅｂｂ Ｍｉｌｌｅｒ，ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９９７），「Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴ ａｎｄ ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ：ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄａｔａｂａｓｅ ｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｇｒａｍｓ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Ｂｌａｓｔ ａｌｇｏｒｉｔｈｍは、インターネットでwww.ncbi.nlm.nih.gov/blastにアクセスすることによっても使用することができる。

[0079] なお、配列表の配列番号９、１０、１１又は１２に示される重鎖アミノ酸配列中で、１乃至１９番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２０乃至１４１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１４２乃至４７１番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号９の配列は図３に、配列番号１０の配列は図４に、配列番号１１の配列は図５に、配列番号１２の配列は図６に各々記載されている。

また、配列表の配列番号１３、１４、１５、１６、１７、１８又は１９に示される軽鎖アミノ酸配列中で、１乃至２０番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、２１乃至１２８番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、１２９乃至２３３番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号１３の配列は図７に、配列番号１４の配列は図８に、配列番号１５の配列は図９に、配列番号１６の配列は図１０に、配列番号１７の配列は図１１に、配列番号１８の配列は図１２に、配列番号１９の配列は図１３に各々記載されている。

[0080] 本発明の抗体としては、さらに、Ｍ３０抗体と同一のエピトープに結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗Ｂ７－Ｈ３ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗Ｂ７－Ｈ３ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９７）１６，ｐ．１３３－１４３，；Ｋｕｒｏｉｗａ，Ｙ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９８）２６，ｐ．３４４７－３４４８；Ｙｏｓｈｉｄａ，Ｈ．ｅｔ．ａｌ．，Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｂａｓｉｃ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ａｓｐｅｃｔｓ　ｖｏｌ．１０，ｐ．６９－７３（Ｋｉｔａｇａｗａ，Ｙ．，Ｍａｔｓｕｄａ，Ｔ．ａｎｄ　Ｉｉｊｉｍａ，Ｓ．ｅｄｓ．），Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９９．；Ｔｏｍｉｚｕｋａ，Ｋ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａ

OnCusp
Ex. 1002

ｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（２０００）９７，ｐ．７２２－７２７等を参照。）によって取得することができる。

[0081] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体（Ｙｅａｓｔ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ，ＹＡＣ）ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製、及びこれらの動物同士を掛け合わせることによって作り出すことができる。

また、遺伝子組換え技術によって、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするｃＤＮＡ、好ましくは該ｃＤＮＡを含むベクターによって真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することによって、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはＣＨＯ細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

[0082] また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法（Ｗｏｒｍｓｔｏｎｅ，Ｉ．Ｍ．ｅｔ．ａｌ，Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｖｅ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ ＆ Ｖｉｓｕａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ．（２００２）４３（７），ｐ．２３０１－２３０８；Ｃａｒｍｅｎ，Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｂｒｉｅｆｉｎｇｓ ｉｎ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ（２００２），１（２），ｐ．１８９－２０３；Ｓｉｒｉｗａｒｄｅｎａ，Ｄ．ｅｔ．ａｌ．，Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ（２００２）１０９（３），ｐ．４２７－４３１等参照。）も知られている。

例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，（９），ｐ．１１０５－１１１６）を用いることができる。

抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を決定することができる。

抗原に結合するｓｃＦｖのＤＮＡ配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによってヒト抗体を取得することができる（ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９３／０６２１３、ＷＯ９３／１１２３６、ＷＯ９３／１９１７２、ＷＯ９５／０１４３８、ＷＯ９５／１５３８８、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９４）１２，ｐ．４３３－４５５、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３（９），ｐ．１１０５－１１１６）。

新たに作製されたヒト抗体が、Ｍ３０抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、Ｍ３０抗体のＢ７－Ｈ３に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する（すなわち、該ヒト抗体が、Ｍ３０抗体とＢ７－Ｈ３の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体がＭ３０抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該ヒト抗体がＭ３０抗体と同等の細胞傷害活性を有していることが強く期待される。

以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

[0083] 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定

OnCusp
Ex. 1002

性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0084] 本発明の抗体には抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗体に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、Ｎ－結合又はＯ－結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、Ｎ－結合又はＯ－結合への糖鎖付加、Ｎ末又はＣ末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによってＮ末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体の修飾物は、元の本発明の抗体の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、かかる抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

[0085] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、ＷＯ９９／５４３４２、ＷＯ００／６１７３９、ＷＯ０２／３１１４０等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合

OnCusp
Ex. 1002

には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）を挙げることができる。

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換によって導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することによって抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体の製造方法によって得られる抗体も含まれる。

[0086] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、

同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0087] 本発明の抗体のアイソタイプとしては、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ２を挙げることができる。

[0088] 抗体の機能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、Ｂ７－Ｈ３に対する結合活性であり、好ましくは抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）活性であり、より好ましくは腫瘍細胞に対するＡＤＣＰ活性を介した細胞傷害活性（抗腫瘍活性）である。更に、本発明の抗体は、ＡＤＣＰ活性に加えて、ＡＤＣＣ活性及び／又はＣＤＣ活性を併せ持っていてもよい。

OnCusp
Ex. 1002

〔0089〕 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。

また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

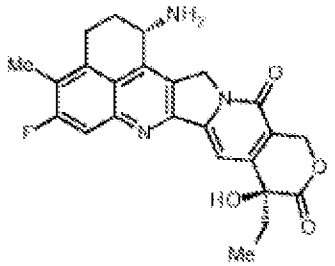
〔0090〕〔抗腫瘍性化合物〕

本発明の抗体－薬物コンジュゲートに結合される抗腫瘍性化合物について述べる。抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍効果を有する化合物であって、リ

ンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離されて抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が本来の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

抗腫瘍性化合物としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤）等を挙げることができる。本発明の抗体ー薬物コンジュゲートにおいては、カンプトテシン誘導体であるエキサテカン（(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン；次式：）

[0091] [化43]



[0092] を好適に使用することができる。このエキサテカンは、優れた抗腫瘍活性を有しているものの、抗腫瘍薬として市販されるには至っていない。同化合物は、公知の方法で容易に取得でき、１位のアミノ基をリンカー構造への結合部位として好適に使用することができる。また、エキサテカンはリンカーの一部が結合した状態で腫瘍細胞内で遊離される場合もあるが、この様な状態でも優れた抗腫瘍効果が発揮される優れた化合物である。

抗体ー薬物コンジュゲートにおいて、抗体１分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体ー薬物コンジュゲートの

製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体１分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。抗体分子へのエキサテカンの結合数はコントロール可能であり、１抗体あたりの薬物平均結合数として、１から１０個程度のエキサテカンを結合させることができるが、好ましくは２から８個であり、より好ましくは３から８個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体を取得することができる。

エキサテカンはカンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えばpH3程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH10程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン残基を導入した薬物コンジュゲートであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれのものも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。

[0093] [リンカー構造]

本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいて抗腫瘍性薬物を抗体に結合するリンカー構造について述べる。当該リンカーは、次式：

$-L^1-L^2-L^3-NH-(CH_2)_{n^1}-L^4-L^5-L^6-$

の構造を有しており、抗体はL^1の末端、L^2が結合するのとは反対側の末端、で結合し、抗腫瘍性薬物はL^6の末端、L^5が結合するのとは反対側の末端で結合する。

n^1は、０から６の整数を示すが、好ましくは１から５の整数であり、より

好ましくは１から３である。

[0094] １．L^1

L^1は、

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-、

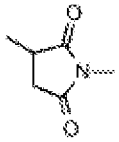
-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は

-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-

の各構造で示される構造のリンカーである。ここで、n^2は、２から８の整数であり、n^3は、１から８の整数であり、n^4は、１から８の整数である。

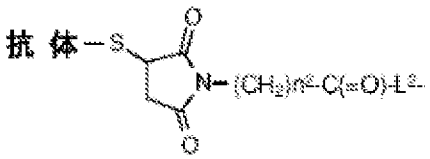
[0095] リンカーL^1のうちの-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、『-(Succinimid-3-yl-N)-』は、次式

[0096] [化44]



[0097] で示される構造を有する。この部分構造における３位が抗体への結合部位である。さらにこの３位での抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。一方、この構造部分の１位の窒素原子は、この構造が含まれるリンカー内に存在するメチレンの炭素原子と結合する。すなわち-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-L^2-は次式で示される構造である（ここで、『抗体－Ｓ－』は抗体由来である。）。

[0098] [化45]



[0099] 式中、n^2は、２から８の整数であるが、好ましくは２から５である。

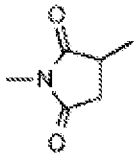
[0100] L^1のうちの-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、n^3は１から８の整数であるが、好ましくは２から６である。このリンカ

ーは、抗体とは末端のメチレンの炭素原子上で結合するが、先と同様にチオエーテルを形成して結合する次の構造を有する（ここで、「抗体－Ｓ－」は抗体由来である。）：

抗体-S-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-。

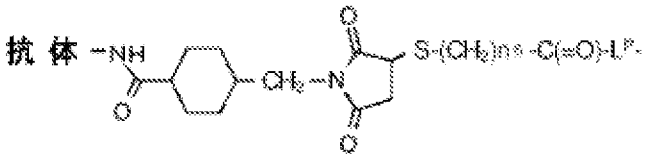
[0101] L^1のうちの-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-で示される構造のリンカーであるが、ここで『-(N-ly-3-diminiccuS)-』は次式：

[0102] [化46]



[0103] で示される構造を有する。この構造部分において、１位の窒素原子は同構造を含むリンカー内に存在するメチレン炭素原子と結合する。３位の炭素原子は、リンカーL^2のうちの-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-と、その末端の硫黄原子において結合する。なお、このL^2のリンカーである-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-は、L^1リンカーのうちの-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-とのみ組み合わされたリンカー構造を形成する。ここで、リンカーに含まれる『-cyc.Hex(1,4)-』は、１，４－シクロヘキサレン基を示す。リンカー-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-は抗体とは末端のカルボニル炭素でアミド結合を形成して結合する（次式；ここで、「抗体－ＮＨ－」は抗体由来である。）。

[0104] [化47]



[0105] このアミド結合を形成する抗体のアミノ基としては抗体のリシン残基の側鎖の末端のアミノ基、あるいは抗体Ｎ末端のアミノ基であればよい。なお、当該構造のリンカーはアミド結合のほか、抗体のアミノ酸の水酸基とエステル結合を形成して結合することもできる。

また、当該リンカーに含まれる『-cyc.Hex(1,4)-』構造部分であるが、１，４－シクロヘキサレン基の他、これ以外の２価の飽和環状アルキレン基である、シクロブチレン基、シクロペンチレン基、シクロヘプタレン基、シクロオクタレン基等の２価の環状飽和炭化水素基であってもよく、フェニレン基、ナフチレン基等の、２価の芳香族炭化水素基であってもよく、また、５員環、６員環の飽和、部分飽和、あるいは芳香族である、１又は２の複素原子を含む２価の複素環基であってもよい。さらには、炭素数１から４の２価のアルキレン基であってもよい。なお、２価基への結合は、隣接した位置であっても離れた位置であってもいずれでもよい。

[0106] リンカーL^1のうちの-C(=O)-$(CH_2)n^6$-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、n^6は１から８の整数であるが、好ましくは２から６である。このリンカーも、上記のリンカーと同様に、末端のカルボニル基において抗体のアミノ基とアミド結合を形成して結合する（次式；当該構造において「抗体－NH－」は抗体由来である。）。

抗体-NH-C(=O)-$(CH_2)n^6$-C(=O)-L^2-。

[0107] リンカーL^1の具体例としては、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-CH_2-C(=O)-、

-CH_2C(=O)NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2C(=O)NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-

-C(=O)-Aryl-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-

-C(=O)-cyc.Het-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-

-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

等を挙げることができる（Arylは２価の芳香族炭化水素基、cyc.Hetは２価の環状複素環基を示す。）。

[0108] ２．L^2

リンカーL^2は、

-NH-$(CH_2CH_2O)n^5$-CH_2-CH_2-C(=O)-、又は

-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-、

で示される構造のリンカーであるが、リンカーL^2は存在しなくともよく、この場合L^2は単結合となる。また、n^5は、１から６の整数であり、n^6は、１から６の整数である。

[0109] リンカーL^2のうちの、-NH-$(CH_2CH_2O)n^5$-CH_2-CH_2-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、n^5は、１から６の整数であるが、好ましくは２から４である。当該リンカーは末端のアミノ基でリンカーL^1に結合し、反対の末端のカルボニル基でリンカーL^Pと結合する。

[0110] リンカーL^2のうちの、-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-において、n^6は、１から６の整数であるが、好ましくは２から４である。

[0111] リンカーL^2の具体例としては、

-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-、

等を挙げることができる。

[0112] さらにリンカーL^{2}が-S-(CH$_2$)n^6-C(=O)-の場合、組み合わさるリンカーL^{1}は、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-であるので、-L^1-L^2-リンカーの具体例としては、

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH$_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH$_2$CH$_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-

等を挙げることができる。

[0113] 3．L^p

リンカーL^{p}は、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である。すなわち、２から６個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチドの残基によって構成される。リンカーL^{p}は、N末端においてリンカーL^{2}に結合し、C末端においてリンカーの-NH-(CH$_2$)n^1-L^a-L^b-L^c-部分のアミノ基に結合する。リンカーL^{p}を構成するアミノ酸は特に限定されることはないが、例えば、L-又はD-アミノ酸であり、好ましくはL-アミノ酸である。また、αーアミノ酸の他、βーアラニン、εーアミノカプロン酸、γーアミノ酪酸等の構造のアミノ酸であってもよく，さらには例えばNーメチル化されたアミノ酸等の非天然型のアミノ酸であってもよい。

[0114] リンカーL^{p}のアミノ酸配列は、特に限定されないが、構成するアミノ酸として、フェニルアラニン（Phe；F）、チロシン（Tyr；Y）、ロイシン（Leu；L），グリシン（Gly；G）、アラニン（Ala；A）、バリン（Val；V）、リシン（Lys；K）、シトルリン（Cit）、セリン（Ser；S）、グルタミン酸（Glu；E）、アスパラギン酸（Asp；D）等を挙げることができる。これ等のうちで好ましくは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸を挙げることができる。アミノ酸の種類によって、薬物遊離のパターンをコントロールすることができる。アミノ

OnCusp
Ex. 1002

酸の数は、２から７個でよい。

[0115] リンカーL^{P}の具体例として、

-GGF-

-DGGF-

-(D-)D-GGF-

-EGGF-

-GGFG-

-SGGF-

-KGGF-

-DGGFG-

-GGFGG-

-DDGGFG-

-KDGGFG-

-GGFGGGF-

を挙げることができる［上記の『(D-)D』はＤ－アスパラギン酸を意味する］。本発明抗体－薬物コンジュゲートの特に好ましいリンカーL^{P}として、-GGFG-を挙げることができる。

[0116] リンカーの-NH-(CH$_2$)$_{n1}$-で示される構造部分であるが、n^{1}は、０から６の整数であるが、好ましくは１から５の整数であり、より好ましくは１から３である。この部分のアミノ基部分がリンカーL^{P}のＣ末端に結合する。

[0117] ４．L^{B}

リンカーのL^{B}は、-C(=O)-NH-、-NR^{1}-(CH$_2$)$_{n7}$-、-O-の各構造のいずれかであるか、又は単結合であるが、n^{7}は、１から６の整数であり、R^{1}は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、-(CH$_2$)$_{n8}$-COOH、又は-(CH$_2$)$_{n9}$-OHであり、n^{8}は、整数の１から４であり、n^{9}は、１から６の整数である。

リンカーのL^{B}のうちのアミド構造である-C(=O)-NH-は、窒素原子側がL^{B}に結合する。リンカーのL^{B}のうちの-NR^{1}-(CH$_2$)$_{n7}$-である構造部分において、n^{7}は、１から６の整数であり、好ましくは１から３である。当該部分はメチレ

ン側がL^bに結合する。R^1は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基であるが、炭素数１から６のアルキル基の場合は、直鎖状であっても分枝鎖状であってもよい。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、２－メチルブチル基、ネオペンチル基、１－エチルプロピル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、４－メチルペンチル基、３－メチルペンチル基、２－メチルペンチル基、１－メチルペンチル基、３，３－ジメチルブチル基、２，２－ジメチルブチル基、１，１－ジメチルブチル基、１，２－ジメチルブチル基、１，３－ジメチルブチル基、２，３－ジメチルブチル基及び２－エチルブチル基等を挙げることができる。これ等のうちで好ましくは、メチル基又はエチル基である。R^1が、$-(CH_2)n^a-COOH$で示される構造のとき、n^aは、整数の１から４であるが、好ましくは１又は２である。R^1が、$-(CH_2)n^a-OH$で示される構造のとき、n^aは、１から６の整数であるが、好ましくは１又は２である。R^1としては、水素原子、メチル基、エチル基、$-CH_2COOH$、$-CH_2CH_2-COOH$、又は$-CH_2CH_2-OH$が好ましく、より好ましくは、水素原子、メチル基、$-CH_2COOH$である。さらに好ましくは水素原子である。なお、リンカーのL^a部分は-O-、又は単結合であってもよい。

[0118] ５．L^b

リンカーのL^bは、$-CR^2(-R^3)-$、-O-、$-NR^4-$の各構造のいずれかであるか、又は単結合であり、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^a-NH_2$、$-(CH_2)n^b-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$であり、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基であり、n^aは、０から６の整数であり、n^bは、整数の１から４であり、n^cは、整数の０から４であるが、n^a又はn^cが０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならない。

R^2及びR^3がアルキル基であるとき、このアルキル基はR^1におけるアルキル基と同様に解釈されるアルキル基である。R^2及びR^3が$-(CH_2)n^a-NH_2$の構造であるとき、n^aは、０から６の整数であるが、好ましくは０であるか、あるいは３から５である。なお、n^aが０であるときはR^2及びR^3は同一にはならない。R

OnCusp
Ex. 1002

^{a}及びR^{3}が$-(CH_{2})n^{b}-COOH$の構造であるとき、n^{b}は、整数の１から４であるが、好ましくは１又は２である。R^{a}及びR^{3}が$-(CH_{2})n^{c}-OH$の構造であるとき、n^{c}は、整数の０から４であるが、好ましくは１又は２である。

R^{a}及びR^{3}として好ましくは、水素原子、メチル基、エチル基、$-NH_{2}$、$-CH_{2}CH_{2}NH_{2}$、$-CH_{2}CH_{2}CH_{2}CH_{2}NH_{2}$、$-CH_{2}CH_{2}CH_{2}CH_{2}CH_{2}CH_{2}NH_{2}$、$-CH_{2}COOH$、$-CH_{2}CH_{2}-COOH$、$-CH_{2}OH$、又は$-CH_{2}CH_{2}-OH$が好ましく、より好ましくは、水素原子、メチル基、$-NH_{2}$、$-CH_{2}CH_{2}CH_{2}CH_{2}NH_{2}$、$-CH_{2}COOH$、$-CH_{2}CH_{2}-COOH$、$-CH_{2}OH$、又は$-CH_{2}CH_{2}-OH$である。さらに好ましくは水素原子である。

R^{d}が、炭素数１から６のアルキル基であり、このアルキル基はR^{1}におけるアルキル基と同様に解釈されるアルキル基である。R^{d}としては水素原子又はメチル基が好ましく、より好ましくは水素原子である。

[0119] リンカーの$-NH-(CH_{2})n^{1}-L^{a}-L^{b}-$で示される構造の具体例として、

$-NH-CH_{2}-$

$-NH-CH(-Me)-$

$-NH-C(-Me)_{2}-$

$-NH-CH_{2}-CHMe-$

$-NH-CH(-CH_{2}OH)-$

$-NH-CH(-CH_{2}COOH)-$

$-NH-CH(-CH_{2}CH_{2}COOH)-$

$-NH-CH(-CH_{2}CH_{2}CH_{2}CH_{2}NH_{2})-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}-$

$-NH-CH_{2}-O-CH_{2}-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}-O-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}-O-CH_{2}-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}C(-Me)_{2}-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}NH-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}NH-CH_{2}-$

$-NH-CH_{2}CH_{2}NMe-CH_{2}-$

-NH-CH_2CH_2NH-CH_2CH_2-

-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2CH_2-

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2COOH)$-CH_2-

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)$-CH_2-

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)$-CH_2CH_2-

-NH-$CH_2CH_2CH_2C(=O)$-NHCH(-CH_2OH)-

-NH-$CH_2CH_2CH_2C(=O)$-NHCH(-CH_2COOH)-

-NH-$CH_2CH_2CH_2C(=O)$-NHCH(-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$)-

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)$-

等を挙げることができる。

[0120] これ等のうち好ましくは、

-NH-CH_2-

-NH-CH_2-CH(Me)-

-NH-CH(-CH_2OH)-

-NH-CH(-CH_2CH_2COOH)-

-NH-CH_2CH_2-

-NH-CH_2-O-CH_2-

-NH-CH_2CH_2-O-

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-

-NH-$CH_2CH_2C(-Me)_2$-

-NH-CH_2CH_2NH-

-NH-CH_2CH_2NH-CH_2-

-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2-

-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2CH_2-

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2COOH)$-CH_2-

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2OH)-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2COOH)-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$

等を挙げることができる。

[0121] より好ましくは、

-NH-CH_2-

-NH-CH_2CH_2-

-NH-CH_2-O-CH_2-

-NH-CH_2CH_2-O-

-NH-$CH_2CH_2-O-CH_2-$

-NH-CH_2CH_2NH-

-NH-$CH_2CH_2NH-CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2COOH)-CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2N(-CH_2CH_2OH)-CH_2CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2C(=O)-NHCH(-CH_2COOH)-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2-$

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$

を挙げることができる。

[0122] さらに好ましくは、

-NH-$(CH_2)_2-$、

-NH-CH_2-O-CH_2-、

-NH-$(CH_2)_2-O-CH_2-$

である。

[0123] 6．L^c

リンカーのL^cは、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$である。当該リンカーにおいて抗腫瘍性化合物と結合する。リンカーのL^cとしては、$-C(=O)-$がより好ましい。

[0124] リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$は、鎖長として４から７原子の鎖長であるものが好ましいが、さらに好ましくは５又は６原子の鎖長を有するものである。

[0125] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、腫瘍細胞内に移動した後にはリンカー部分が切断され、$NH_2-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$で示される構造の薬物誘導体が遊離して抗腫瘍作用を発現する。本発明の抗体－薬物コンジュゲートから遊離され抗腫瘍効果を発現する抗腫瘍性誘導体としては、先に挙げたリンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$で示される構造にL^cを結合させ、末端がアミノ基となった構造部分を有する抗腫瘍性誘導体を挙げることができるが、特に好ましいものは次のものである：

$NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$NH_2-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$NH_2-CHCH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

なお、$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$の場合は同分子内にあるアミナール構造が不安定であるため、さらに自己分解して

$HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

が遊離されることが確認された。これらの化合物は本発明の抗体－薬物コンジュゲートの製造中間体としても好適に用いることができる。

[0126] 薬物をエキサテカンとする本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物－リンカー構造部分［$-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$］を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物－リンカー構造部分は、１抗体あたりの平均結合数として、１から１０を結合させればよいが、好ましくは２から８であり、より好ましくは３から８である。

$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

これ等のうちでより好ましくは、次のものである。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

OnCusp
Ex. 1002

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

さらに、好ましくは、次のものである。

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

[0127] 本願の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、これまで述べたリンカー各部において示した好ましい構造のものを結合することで好ましいリンカーを構築することができる。この様なリンカー構造として以下の構造のものを好適に使用することができる。なお構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

これ等のうちでより好ましくは、次のものである。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-

OnCusp
Ex. 1002

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH

-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

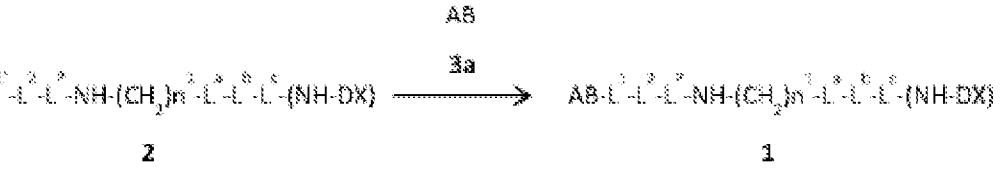
[0128] [製造方法]

次に、本発明の抗体－薬物コンジュゲートあるいはその製造中間体の代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式（１）の化合物』、『化合物（１）』等と称する。またこれ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0129] １．製造方法１

式（１）で示される抗体－薬物コンジュゲートのうち、チオエーテルを介して抗体とリンカー構造が結合しているものは例えば下記の方法によって製造することができる。

[0130] [化48]



[0131] [式中、ＡＢは、スルフヒドリル基を有する抗体を示し、Ｌ１’は、Ｌ１で示されるリンカー構造において、リンカー末端がマレイミジル基（次式）

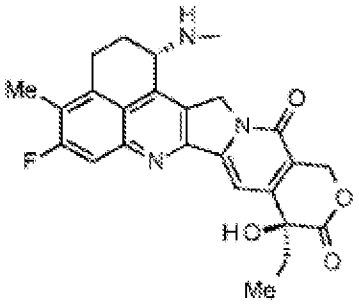
[0132] [化49]



[0133] となった構造であるか（ここで、窒素原子が結合部位である。）、又は末端がハロゲンとなった構造のリンカーを示すが、Ｌ１のうちの-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-において-(Succinimid-3-yl-N)-部分がマレイミジル基となった基、又はＬ１における-CH_2C(=O)NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-の末端のメチレンがハ

ロゲン化されてハロアセトアミドとなった、Halogen-$CH_2C(=O)NH-(CH_2)n^3-C(=O)$-基を示す。また、-(NH-DX)は次式：

[0134] [化50]



[0135] で示される構造であり、エキサテカンの１位のアミノ基の水素原子１個が除かれて生成する基を示す。また、上記の反応式において式（１）の化合物では、薬物からリンカー末端までの構造部分１個が１の抗体に対して結合した構造として記載されているが、これは説明のための便宜的な記載であって、実際には当該構造部分が抗体分子に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。]

[0136] すなわち、後述する方法によって入手しうる化合物（２）と、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を反応させることによって、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）は、当業者周知の方法で得ることができる（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、ｐｐ．５６－１３６、ｐｐ．４５６－４９３、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。例えば、Ｔｒａｕｔ’ｓ試薬を抗体のアミノ基に作用させる；Ｎ－サクシンイミジルＳ－アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；Ｎ－サクシンイミジル３－（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、２－メルカプトエタノール、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ)等の還元剤を抗体に作用させて抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元しスルフヒ

OnCusp
Ex. 1002

ドリル基を生成させる；等等の方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。

具体的には、還元剤としてＴＣＥＰを、抗体内ヒンジ部ジスルフィド一個当たりに対して０．３乃至３モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内ヒンジ部ジスルフィドが部分的もしくは完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）やジエチレントリアミン５酢酸（ＤＴＰＡ）等を挙げることができる。これ等を１ｍＭ乃至２０ｍＭの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的な例において、抗体は４℃乃至３７℃にて１乃至４時間ＴＣＥＰと反応させることで部分的もしくは完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を得ることが出来る。

なお、ここでスルフヒドリル基を薬物－リンカー部分に付加させる反応を実施させることでチオエーテル結合によって薬物－リンカー部分を結合させることができる。

次に、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）一個あたり、２乃至２０モル当量の化合物（２）を使用して、抗体１個当たり２個乃至８個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。具体的には、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に、化合物（２）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、等を用いればよい。反応時のｐＨは５乃至９であり、より好適にはｐＨ７付近で反応させればよい。化合物（２）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、Ｎ－メチル－２－ピリドン（ＮＭＰ）等の有機溶媒を用いることができる。化合物（２）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に１乃至２０％ｖ／ｖを加えて反応させればよい。反応温度は、０乃至３７℃、より好適には１０乃至２５℃であり、反応時間

は、０．５乃至２時間である。反応は、未反応の化合物（２）の反応性をチオール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システインまたはＮ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）である。より具体的には、ＮＡＣを、用いた化合物（２）に対して、１乃至２モル当量加え、室温で１０乃至３０分インキュベートすることにより反応を終了できる。

製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）は、以下の共通操作によって濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定を行うことができる。

[0137] 共通操作Ａ：抗体もしくは抗体－薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ（５０，０００ ＭＷＣＯ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）の容器内に抗体もしくは抗体－薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機（Ａｌｌｅｇｒａ Ｘ－１５Ｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を用いた遠心操作（２０００Ｇ乃至３８００Ｇにて５乃至２０分間遠心）にて、抗体もしくは抗体－薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

共通操作Ｂ：抗体の濃度測定

ＵＶ測定器（Ｎａｎｏｄｒｏｐ １０００，Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．）を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる２８０ｎｍ吸光係数（１．３ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$乃至１．８ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）を用いた。

共通操作Ｃ－１：抗体のバッファー交換

Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５担体を使用したＮＡＰ－２５カラム（Ｃａｔ．Ｎｏ．１７－０８５２－０２，ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｊａｐａｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、メーカー説明書の方法に従い、塩化ナトリウム（１３７ｍＭ）及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ，５ｍＭ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ６．０）（本明細書でＰＢＳ６．０／ＥＤ

ＴＡと称する。）にて平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラム一本につき、抗体水溶液２．５ｍＬをのせたのち、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させた画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行ったのちに、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡを用いて１０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

共通操作Ｃ－２：抗体のバッファー交換

Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５担体を使用したＮＡＰ－２５カラム（Ｃａｔ．Ｎｏ．１７－０８５２－０２，ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｊａｐａｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム（５０ｍＭ）及びＥＤＴＡ（２ｍＭ）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ，ｐＨ６．５）（本明細書でＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡと称する。）にて平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラム一本につき、抗体水溶液２．５ｍＬをのせたのち、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させた画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行ったのちに、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡを用いて２０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

共通操作Ｄ－１：抗体－薬物コンジュゲートの精製

市販のリン酸緩衝液（ＰＢＳ７．４，Ｃａｔ．Ｎｏ．１００１０－０２３，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、塩化ナトリウム（１３７ｍＭ）を含むリン酸ナトリウム緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ６．０；本明細書でＰＢＳ６．０と称する。）もしくはＳｏｒｂｉｔｏｌ（５％）を含む酢酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ５．５；本明細書でＡＢＳと称する。）のいずれかの緩衝液でＮＡＰ－２５カラムを平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラムに、抗体－薬物コンジュゲート反応水溶液（約１．５ｍＬ）をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びＮＡＰ－２５カラムにのせ緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計２乃至３回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ），Ｎ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ

OnCusp
Ex. 1002

），ジメチルスルホキシド）を除いた抗体－薬物コンジュゲートを得た。

共通操作Ｅ：抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定

抗体－薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、抗体－薬物コンジュゲート水溶液の２８０ｎｍ及び３７０ｎｍの二波長におけるＵＶ吸光度を測定したのちに下記の計算を行うことで、算出することができる。

ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい［吸光度の加成性］ことから、抗体と薬物のコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

$$A_{280}=A_{D,280}+A_{A,280}=\varepsilon_{D,280}C_D+\varepsilon_{A,280}C_A \quad 式（１）$$

$$A_{370}=A_{D,370}+A_{A,370}=\varepsilon_{D,370}C_D+\varepsilon_{A,370}C_A \quad 式（２）$$

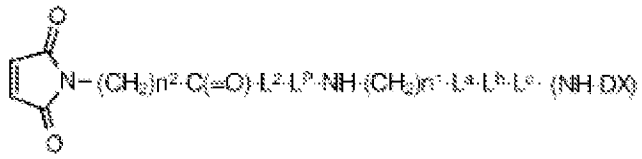
ここで、A_{280}は２８０ｎｍにおける抗体－薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、A_{370}は３７０ｎｍにおける抗体－薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、$A_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$A_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$\varepsilon_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、C_Aは抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、C_Dは抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。

ここで、$\varepsilon_{A,280}$、$\varepsilon_{A,370}$、$\varepsilon_{D,280}$、$\varepsilon_{D,370}$は、事前に用意した値（計算推定値もしくは化合物のＵＶ測定から得られた実測値）が用いられる。例

えば、$\varepsilon_{A,280}$は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423）によって推定することが出来る。$\varepsilon_{A,370}$は、通常、ゼロである。$\varepsilon_{D,280}$及び$\varepsilon_{D,370}$は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝　モル濃度×モル吸光係数×　セル光路長）によって、得ることができる。抗体－薬物コンジュゲート水溶液のA_{280}及びA_{370}を測定し、これらの値を式（１）及び（２）に代入して連立方程式を解くことによって、C_A及びC_Dを求めることができる。さらにC_DをC_Aで除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求めることができる。

[0138] 製造方法１における式（２）で示される化合物であるが、次式のいずれかである。

[0139] [化51]



Halogen-$CH_2C(=O)NH-(CH_2)n^3-C(=O)-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$(NH-DX)

[0140] 上記式中、n^1、n^2、n^3、L^2、L^P、L^a、L^b及びL^cは、既に定義したとおりであり、L^cは薬物との結合部位となる。

[0141] このような本発明化合物の製造に有用な中間体として好ましいものは、n^2としては、整数の２から５であり、L^2は-NH-$(CH_2CH_2O)n^5$-CH_2CH_2-C(=O)-であるか単結合であり、n^5は、２から４であり、L^PはGGFGであり、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-は、-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-の部分構造が好ましい。またHalogenとしては臭素又はヨウ素が好ましい。これ等の化合物について具体的には以下のものを例示することができる［ここで，(maleimid-N-yl)は、マレイミジル基（2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl基）を意味する］。

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2C

H_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-

NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

ここで，式中のＸは、臭素原子又はヨウ素原子を示す。これらの臭素化合物及びヨウ素化合物はいずれも製造中間体として好適に使用することができる。

なお、コンジュゲートの量を確保するために、同様な条件で作製して得られた平均薬物数が同程度の複数のコンジュゲート（例えば±１程度）を混合して新たなロットにすることができる。その場合，平均薬物数は混合前の平均薬物数の間に収まる。

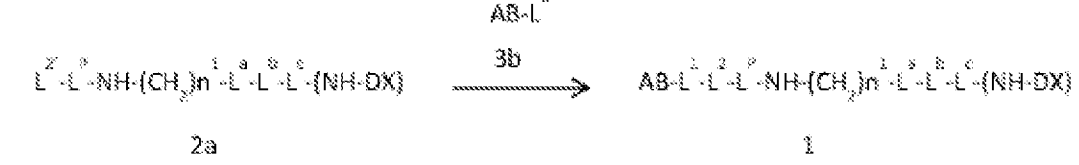
[0142] ２．製造方法２

式（１）で示される抗体－薬物コンジュゲートのうち、抗体との結合がア

OnCusp
Ex. 1002

ミド基であって、チオエーテル結合をリンカー内に有するリンカーである、具体的には-L^1-L^2-が-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-(CH$_2$)n^6-C(=O)-の構造であるものは、下記の方法によっても製造することができる。

[0143] [化52]



2a 1

[0144] [式中、AB-L$^{2'}$は、抗体とリンカーL^{2}が結合し、さらにL^{1}の末端がN－マレイミジル基に変換された基を示すが、具体的にはAB-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH$_2$-(N-Ly-3-diminiccuS)-において、-(N-Ly-3-diminiccuS)-がマレイミジル基に変換された構造である。L$^{1'}$は末端がメルカプト基となったHS-(CH$_2$)n^6-C(=O)-基を示し、ＡＢは抗体を示す。]

[0145] すなわち、後述する方法によって入手しうる化合物（２ａ）と、マレイミジル基を有するリンカーを結合させた抗体（３b）を反応させることによって、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

マレイミジル基を有する抗体（３b）も当業者周知の方法で得ることができる（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、ｐｐ．５６－１３６、ｐｐ．４５６－４９３、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９９６））。例えばアミノ基、ヒドロキシル基との結合性を有しマレイミジル基を有するサクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（ＳＭＣＣ）等の二官能性リンカーをリガンドのアミノ基に作用させマレイミジル基を導入する等の方法を挙げることができるが、これらに限定されない。

例えば、アミノ基への反応性部分と、チオール基への反応性部分をリンカーで結合した化合物であれば好適に使用することができる。ここでアミノ基への反応性部分は、活性エステル、イミドエステル等であればよく、またチ

オール反応性部分は、マレイミジル、ハロゲン化アセチル、ハロゲン化アルキル、さらにはジチオピリジル等であればよい。

抗体を構成するアミノ酸のアミノ基又は水酸基、特にアミノ基においてアミド結合を介してリンカーを構築させるための方法として，先ず抗体に反応させる化合物は、次式：

$Q^1-L^{1a}-Q^2$

［式中、Q^1は、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-、(3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-、R^Q-O-C(=N)-、又はO=C=N-を示し、

L^{1a}-は、-cyc.Hex(1,4)-CH_2-、炭素数１から１０のアルキレン基、フェニレン基、-$(CH_2)n^{a4}$-C(=O)-、-$(CH_2)n^{a5}$-NH-C(=O)-$(CH_2)n^{a6}$-、又は-$(CH_2)n^{a4}$-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-を示し、

Q^2は(maleimid-N-yl)、ハロゲン原子、又は-S-S-(2-Pyridyl)を示すが、

R^Qは、炭素数１から６のアルキル基、n^4は、１から８の整数を示し、n^{a4}は０から６の整数、n^{a6}は１から６の整数を示す。］

で示される化合物であればよい。

ここで、R^Qは、炭素数１から６のアルキル基であればよいが、より好ましくはメチル基またはエチル基である。

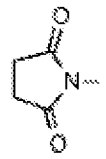
L^{1a}におけるアルキレン基としては、炭素数１から１０のものであればよい。フェニレン基としては、オルト、メタ、パラいずれのものでもよいが、パラ、またはメタのものがより好ましい。

L^{1a}として好ましいものは、-cyc.Hex(1,4)-CH_2-、-$(CH_2)_5$-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-、-$(CH_2)_2$-NH-C(=O)-CH_2-、-$(CH_2)_5$-NH-C(=O)-$(CH_2)_2$-、-CH_2-、-$(CH_2)_2$-、-$(CH_2)_3$-、-$(CH_2)_5$-、-$(CH_2)_{10}$-、-(para-Ph)-、-(meta-Ph)-、-(para-Ph)-CH(-CH_3)-、-$(CH_2)_2$-(meta-Ph)-、又は-(meta-Ph)-NH-C(=O)-CH_2-を挙げることができる。

Q^1として好ましくは(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-であり、Q^2は、(maleimid-N-yl)が好ましいが、ジスルフィド結合を形成させようとするときは-S-S-(2-Pyridyl)を使用すればよい。

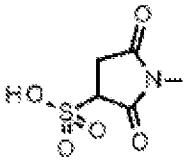
ここで，(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

[0146] [化53]



[0147] で示される窒素原子が結合部位である基であり、(3-Sulfo-pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

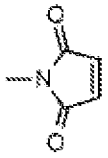
[0148] [化54]



[0149] で示される窒素原子が結合部位である基であり、このスルホン酸はリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩を形成でき、好ましくはナトリウム塩であり、cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

(maleimid-N-yl)は、次式

[0150] [化55]



[0151] で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

(2-Pyridyl)は、２－ピリジル基を示し、(para-Ph)はパラフェニレン基を示し、(meta-Ph)は、メタフェニレン基を示す。

この様な化合物として例えば、スルフォスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミジルメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（sulfo-SMCC）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミジルメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート）（ＬＣ－ＳＭＣＣ）、κ－マレイミジルウンデカン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、

γ－マレイミジル酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミジルカプロン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミジルベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミジルアセトキシ）－スクシンイミドエステル(ＡＭＡＳ)、スクシンイミジル－６－（β－マレイミジルプロピオンアミド）ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミジルフェニル）－ブチレート（ＳＭＰＢ）、Ｎ－（ｐ－マレイミジルフェニル）イソシアネート（ＰＭＰＩ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジルヨードアセテート（ＳＩＡ）、Ｎ－スクシンイミジルブロモアセテート（ＳＢＡ）Ｎ－スクシンイミジル３－（ブロモアセトアミド）プロピオネート（ＳＢＡＰ）、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリドジチオ）プロピオネート（SPDP）、及びスクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（SMPT）等の化合物である。

具体的には、例えば、抗体（３）に対して、２乃至６当量のＳＭＣＣを、ｐＨ６乃至７のリン酸緩衝液中で、室温かつ１乃至６時間反応させることで、ＳＭＣＣの活性エステルが抗体と反応しマレイミジル基を有する抗体（３ｂ）を得ることが出来る。得られた抗体（３ｂ）は下記の共通操作Ｄ－２によって精製し、次の化合物（２ａ）との反応に用いることができる。

共通操作Ｄ－２：サクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミジルメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）誘導体化抗体の精製

ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡでＮＡＰ－２５カラムを平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラムに、サクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミジルメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（本明細書でＳＭＣＣと称する。）誘導体化抗体を含む反応液（約０．５ｍＬ）をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取し、精製を行った。

リンカーとの結合に供される抗体のアミノ基は、Ｎ末端アミノ基及び／又はリシン残基が有するアミノ基であればよいがこれ等に限定されることはな

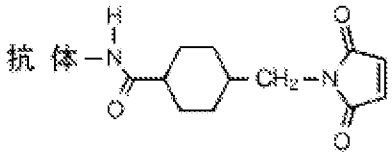
い。さらにセリン残基が有する水酸基を利用してエステル結合を形成させてリンカーと結合させることもできる。

化合物（２ａ）と、マレイミジル基を有するリンカーを結合させた抗体（３b）の反応は、製造方法１で述べた、化合物（２）と、スルフヒドリル基を有する抗体（３a）の反応方法の場合と同様にして行うことができる。

製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）における、濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定による抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定は製造方法１と同様に行うことが出来る。

製造方法２において式（３b）で示される化合物は次の構造を有する（次式；当該構造において「抗体－ＮＨ－」は抗体由来である。）。

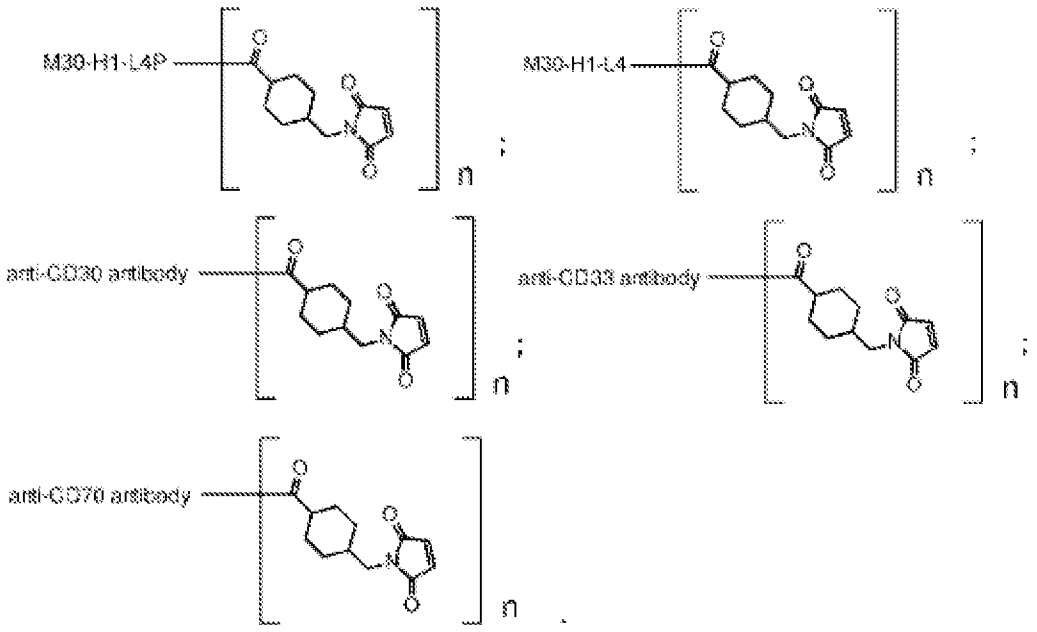
[0152] [化56]



[0153] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートを製造するための中間体であって上記の構造を有する化合物は次の通りである（式中、ｎは、１から１０の整数であるが、好ましくは２から８であり、より好ましくは３から８である。）。

[0154]

[化57]



[0155] さらに末端がメルカプト基となった本発明の化合物としては以下のものを挙げることができる。

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

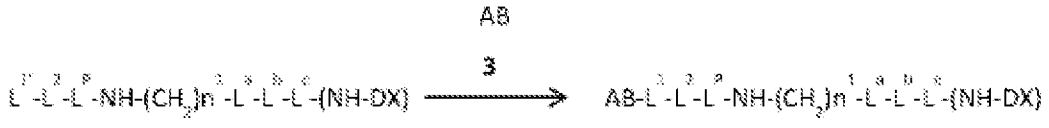
HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0156] 3．製造方法３

式（１）で示される抗体－薬物コンジュゲートであって、アミド結合を介して薬物リンカー部分と抗体が結合したものは、以下の方法で製造することができる。例えばL^1が-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C（=O）-であり、これが活性エステルとなった$L^{1'}$、例えば(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-を好適に使用することができる。さらにL^2が単結合である場合は、例えば下記の方法によって製造することができる。

[0157] [化58]



[0158] すなわち、後述する方法によって入手しうる化合物（２ｂ）と、抗体（３）を反応させることによって、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

化合物（２ｂ）は抗体のアミノ基、ヒドロキシル基との結合性を有する。抗体のアミノ基、ヒドロキシル基は、製造方法２で記したように、それぞれ例えば抗体の有するＮ末端アミノ基及び／又はリシン残基が有するアミノ基、セリン残基が有する水酸基を示すが、これらに限定されない。

化合物（２ｂ）はＮ－ヒドロキシスクシンイミジルエステル基から成る活

性エステルであるが、他の活性エステル、例えばスルホスクシンイミジルエステル基、Ｎ－ヒドロキシフタルイミジルエステル、Ｎ－ヒドロキシスルホフタルイミジルエステル、オルトーニトロフェニルエステル、パラーニトロフェニルエステル、２，４－ジニトロフェニルエステル、３－スルホニル－４－ニトロフェニルエステル、３－カルボキシ－４－ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル等も使用することができる。

化合物（２ｂ）と、抗体（３）の反応は、抗体（３）一個あたり、２乃至２０モル当量の化合物（２ｂ）を使用して、抗体１個当たり１個乃至１０個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。具体的には、抗体（３）を含む緩衝液に、化合物（２ｂ）を溶解させた溶液を加えて反応させることにより、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。ここで、緩衝液として、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム等を用いることができる。反応時のｐＨは５乃至９であればよく、より好適にはｐＨ７付近で反応させればよい。化合物（２ｂ）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、Ｎ－メチル－２－ピリドン（ＮＭＰ）等の有機溶媒を用いることができる。化合物（２ｂ）を溶解させた有機溶媒溶液を、抗体（３）を含む緩衝液に１乃至２０％ｖ／ｖを加えて反応させればよい。反応温度は、０乃至３７℃、より好適には１０乃至２５℃であり、反応時間は、０．５乃至２０時間である。

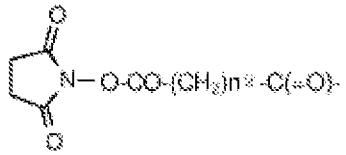
製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）における、濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定による抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定は製造方法１と同様に行うことが出来る。

製造方法３において(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-は次の構造を有する。

[0159]

OnCusp
Ex. 1002

[化59]



[0160] 上記の部分構造を有する本発明の化合物としては以下のものを挙げることができる。

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

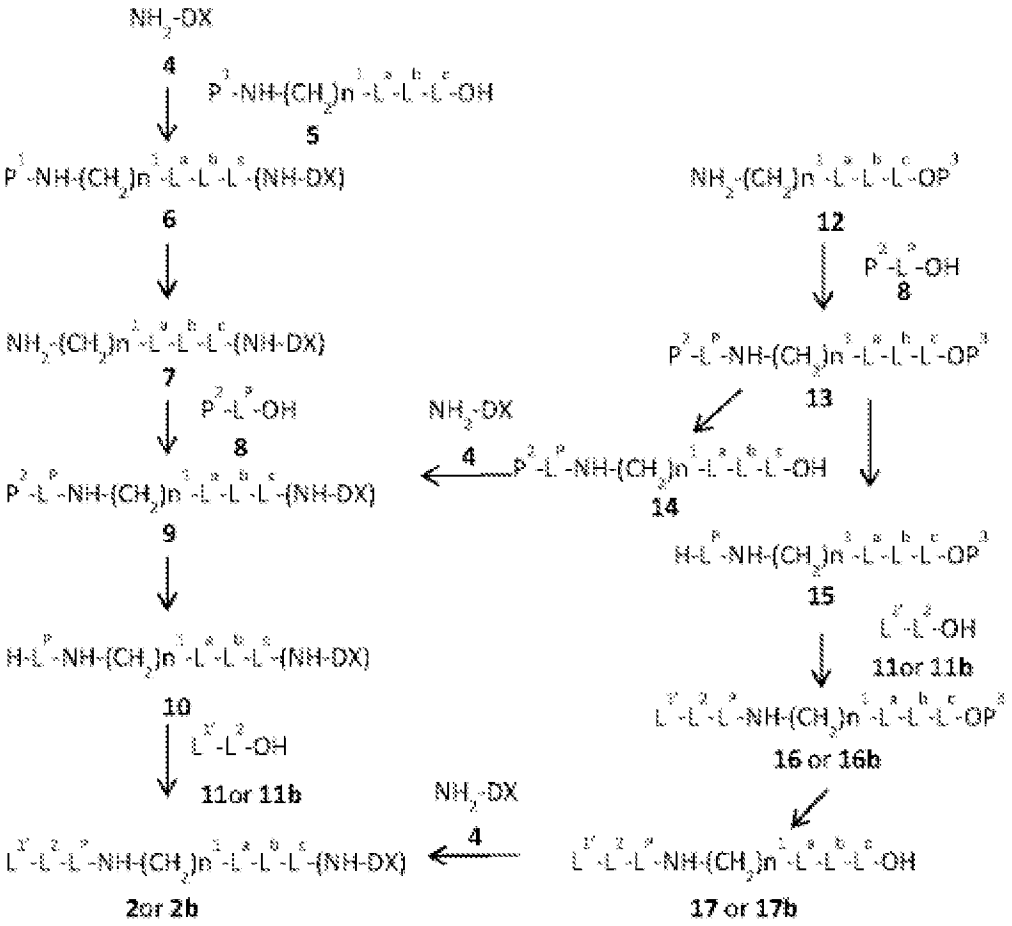
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0161] 4．製造方法4

先の製造方法で使用した中間体である式（2）又は（2b）で示される化合物及びそれらの薬理上許容される塩は例えば下記の方法によって製造することができる。

[0162] [化60]



[0163] [式中、L^aは-C(=O)-であって-(NH-DX)との結合はアミド結合を形成し、L^1'は末端マレイミジル基、又は末端ハロアセチル基、又は(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$(CH_2)_{n4}$-C(=O)-に変換された構造のL^1を示し、P^1、P^2及びP^3は保護基を示す。]

[0164] カルボン酸（５）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、NH_2－ＤＸ［エキサテカンを示す；化学名：(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ［de］ピラノ［3',4':6,7］インドリジノ［1,2-b］キノリン-10,13（9H,15H）-ジオン］（４）またはその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（６）を製造することができる。

この反応は、ペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよい

。活性エステルには各種のものがあるが、例えばｐ－ニトロフェノール等のフェノール類、Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾールあるいはＮ－ヒドロキシスクシンイミド等とカルボン酸（５）をＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミドあるいは１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩等の縮合剤を用いて反応させれば製造できる。また、活性エステルは、カルボン酸（５）とペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート等との反応；カルボン酸（５）と１－ベンゾトリアゾリルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファイトとの反応；カルボン酸（５）とシアノホスホン酸ジエチルとの反応（塩入法）；カルボン酸（５）とトリフェニルホスフィン及び２，２’－ジピリジルジスルフィドとの反応（向山法）；カルボン酸（５）と４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド（ＤＭＴＭＭ）のようなトリアジン誘導体との反応；等によっても製造することができる。また、カルボン酸（５）を塩基存在下に塩化チオニル、オキザリルクロリド等の酸ハロゲン化物で処理することによって製造できる酸ハライド法等によって反応を行うこともできる。上記のように得たカルボン酸（５）の活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物を化合物（４）と適当な塩基存在下に不活性な溶媒中で－７８℃～１５０℃で反応させることによって化合物（６）を製造することができる（なお、「不活性な溶媒」とはその溶媒が採用された反応において実施される反応を阻害することのない溶媒を意味する。）。

〔0165〕 上記の各工程に用いる具体的な塩基としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、ナトリウムエトキシド、カリウムブトキシド、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウムのような、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の炭酸塩、アルカリ金属アルコキシド、アルカリ金属水酸化物もしくは水素化物、又はｎ－ブチルリチウムのようなアルキルリチウム、リチウムジイソプロピルアミドのようなジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウムビス（トリメチルシリル）

アミドのようなビスシリルアミンの有機金属塩基；又はピリジン、２，６－ルチジン、コリジン、４－ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、Ｎ－メチルモルホリン、ジイソプロピルエチルアミン、ジアザビシクロ［５，４，０］ウンデク－７－エン（ＤＢＵ）のような有機塩基等を挙げることができる。

〔0166〕 本反応に用いる不活性な溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素系溶媒；テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタン、ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリジン－２－オン等のアミド系溶媒；を挙げることができ、これらに加えて場合によってはジメチルスルホキシド、スルホラン等のスルホキシド系溶媒；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒；等を使用することも可能である。

〔0167〕 化合物（６）のＬ^{a}及びＬ^{b}は、後述するように、その水酸基、カルボキシ基、アミノ基等が有機化合物の合成に通常用いられる保護基で保護されていてよい。具体的には水酸基の保護基としては、メトキシメチル基等のアルコキシメチル基；ベンジル基、４－メトキシベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；アセチル基等のアルカノイル基；ベンゾイル基等のアロイル基；ｔｅｒｔ－ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；等を挙げることができる。カルボキシ基は、メチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基等のアルキル基、アリル基、又はベンジル基等のアリールメチル基とのエステル等として保護することができる。アミノ基は、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルキルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニル、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、パラメトキシベンジルオキシカルボニル基、パラ（又はオルト）ニトロベンジルオキシカルボニル基等のアリールメチル基；のほか、アセチル基等のアルカノイル基；ベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；ベンゾイル基等のア

ロイル基；又は２，４－ジニトロベンゼンスルホニル基、オルトニトロベンゼンスルホニル基等のアリールスルホニル基；等、ペプチド合成に通常用いられているアミノ基の保護基によって保護することができる。上記の保護基の着脱は、通常実施される方法に従って行えばよい。

[0168] 化合物（６）の末端アミノ基の保護基P^1としては、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基や９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等、ペプチド合成に通常用いられているアミノ基の保護基を用いることができる。他のアミノ基の保護基としては、アセチル基等のアルカノイル基；メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；パラメトキシベンジルオキシカルボニル基、パラ（又はオルト）ニトロベンジルオキシカルボニル基等のアリールメトキシカルボニル基；ベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；ベンゾイル基等のアロイル基；又は２，４－ジニトロベンゼンスルホニル基、オルトニトロベンゼンスルホニル基等のアリールスルホニル基；を挙げることができる。保護基P^1は、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて取捨選択すればよい。

得られた化合物（６）の末端アミノ基の保護基P^1を脱保護させることによって化合物（７）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

Ｎ末端をP^2で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（７）に反応させることによって、化合物（９）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（７）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^2は、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて取捨選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられているように、ペプチドカルボン酸（８）を構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応と脱保護を繰り返し、伸長させて化

OnCusp
Ex. 1002

合物（９）を製造することもできる。

得られた化合物（９）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることによって化合物（１０）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（１１）及び（１１ｂ）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（１０）に反応させることによって、化合物（２）又は（２ｂ）を製造することができる。カルボン酸（１１）又は（１１ｂ）と化合物（１０）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0169] 化合物（９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

Ｎ末端をP^2で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、カルボキシ基をP^3で保護したアミン化合物（１２）と反応させることによって化合物（１３）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（１２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。化合物（１３）のアミノ基の保護基P^2は化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。カルボキシ基の保護基P^3としては、有機合成化学、中でもペプチド合成においてカルボキシ基の保護基として通常用いられている保護基を使用すればよく、具体的にはメチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル等のアルキルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル等、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。この場合に、アミノ基の保護基とカルボキシ基の保護基が異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^2がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^3がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基はアミノ基とカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて上述したものから取捨選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試

OnCusp
Ex. 1002

薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（１３）のカルボキシ基の保護基P^3を脱保護させることによって化合物（１４）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（１４）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（９）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び塩基や不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0170] 化合物（２）又は（２ｂ）は例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（１３）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることによって化合物（１５）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）又は（１１ｂ）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（１５）と反応させることによって化合物（１６）又は（１６ｂ）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１１）又は（１１ｂ）と化合物（１５）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１６）又は（１６ｂ）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（１７）又は（１７ｂ）を製造することができる。化合物（１４）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

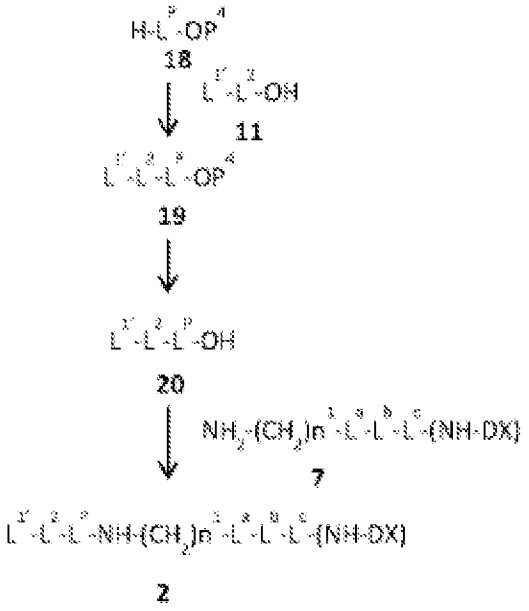
化合物（１７）又は（１７ｂ）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（２）又は（２ｂ）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び

塩基や不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0171] ５．製造方法５

中間体の式（２）で示される化合物は下記の方法によっても製造することもできる。

[0172] [化61]



[0173] [式中、Ｌ$^{1'}$は末端がマレイミジル基、又はハロアセチル基に変換された構造のＬ^{1}であり、Ｐ^{4}は保護基を示す。]

[0174] 化合物（１１）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、Ｃ末端をＰ^{4}で保護したペプチドカルボン酸（１８）と反応させることによって化合物（１９）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１８）と化合物（１１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。化合物（１８）のカルボキシ基の保護基Ｐ^{4}は化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１９）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（２０）を製造することができる。化合物（１４）の製造におけ

OnCusp
Ex. 1002

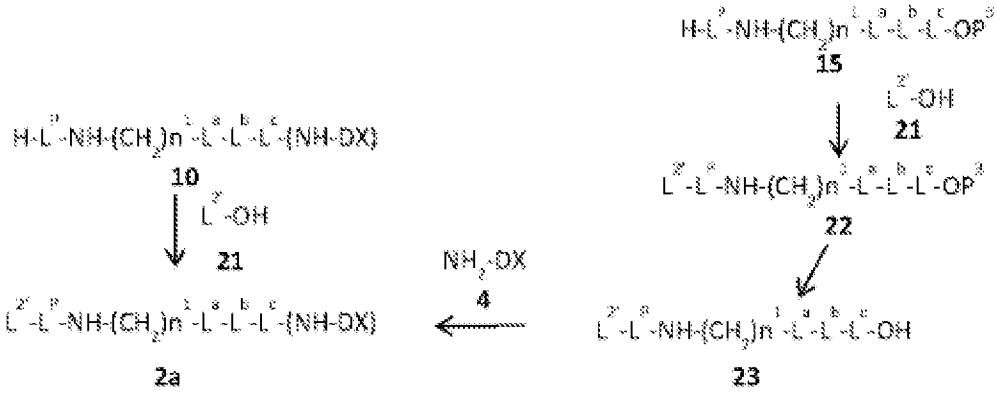
るカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

得られた化合物（２０）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、化合物（７）に反応させることによって、化合物（２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び塩基や不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0175] ６．製造方法６

製造方法２に記載の製造中間体（２ａ）であって、$L^{2'}$が末端メルカプトアルカノイル基に変換された構造のL^2である化合物は、下記の方法によって製造することができる。

[0176] [化62]



[0177] 末端メルカプト基を有するカルボン酸（２１）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、化合物（１０）に反応させることによって、化合物（２ａ）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び塩基や不活性な溶媒は化合物（４）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

また、化合物（２１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、化合物（１５）と反応させ、得られる化合物（２２）のカルボキシ基の保護基を脱保護することによって、化合物（２３）を製造することができる。

化合物（２３）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に

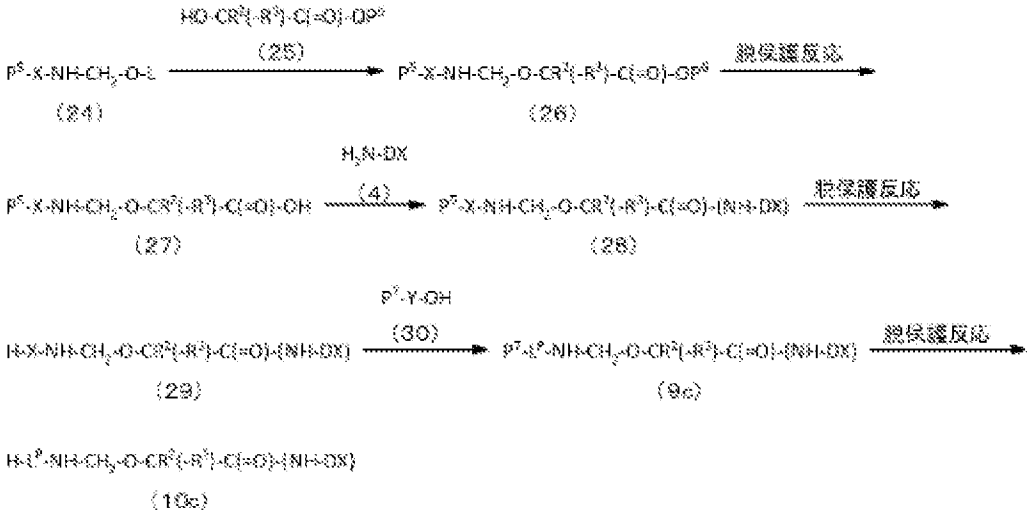
OnCusp
Ex. 1002

誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（２ａ）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び塩基や不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0178] ７．製造方法７

以下に、製造方法４に記載の製造中間体（１０）のうち、n^1=1、L^a=0、及びL^b=$CR^2(-R^3)$の化合物（１０ｃ）の製造方法について詳述する。式（１０ｃ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物、例えば下記の方法で製造することができる。

[0179] [化63]



[0180] [式中、L^a、R^2、及びR^3は前記と同じものを示し、Ｌはアセチル基又は水素原子等を、Ｘ及びＹは１から３個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを、P^6及びP^7はアミノ基の保護基を、P^8はカルボキシ基の保護基を示す。]

[0181] 式（２４）で示される化合物は、特開２００２－６０３５１号公報に記載される手法や文献（Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，５１巻，３１９６頁，１９８６年）記載の方法、もしくはその方法を応用し、必要に応じて保護基の除去や官能基変換を行うことによって、製造することができる。又は、末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチドの酸アミドをアルデヒド又はケトンと処理することによって得ることができる。

OnCusp
Ex. 1002

化合物（２４）を、不活性な溶媒中、酸または塩基存在下に冷却下～室温下で水酸基を有する化合物（２５）と反応させることによって、化合物（２６）を製造することができる。用いる酸としては例えば、フッ化水素酸、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ホウ酸等の無機酸、酢酸、クエン酸、パラトルエンスルホン酸、メタンスルホン酸等の有機酸、テトラフルオロボレート、塩化亜鉛、塩化スズ、塩化アルミニウム、塩化鉄等のルイス酸等を挙げることができる。特にパラトルエンスルホン酸が好ましい。用いる塩基としては、前記の塩基の中から適宜選択して使用すればよく、特にカリウムｔｅｒｔ－ブトキシド等のアルカリ金属アルコキシド、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物、リチウムジイソプロピルアミド等のジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基、リチウムビス（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基等が好ましい。反応に用いる溶媒としては、テトラヒドロフラン、１，４－ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；等が用いられる。上記の溶媒は水との混合物としてもよい。また、P^5に例示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法４で記載したアミノ基の保護基を挙げることができるが、本反応中においてP^5に例示されるアミノ基の保護基が切断される場合がある。その場合には、必要に応じて適当なアミノ基の保護試薬と反応させる必要がある。

化合物（２７）は、化合物（２６）の保護基P^6を除去することによって製造することができる。ここで、P^6として例示されるカルボキシ基の保護基としては、代表的なものを製造方法４に記載したが、この場合にはアミノ基の保護基P^5とカルボキシ基の保護基P^6が異なる方法又は条件で除去できる保護基であることが望ましい。例えば、P^5が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^6がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基は，アミノ基及びカルボキシ基を保

OnCusp
Ex. 1002

護する化合物の性質等に応じて取捨選択すればよく、それらの保護基の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（２７）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）及びそれらの薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（２８）を製造し、得られた化合物（２８）の保護基P^6を除去することによって化合物（２９）を製造することができる。化合物（４）とカルボン酸（２７）との反応及び保護基P^6を除去する反応では、製造方法４で述べた試薬や反応条件と同様なものを用いればよい。

化合物（２９）と末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチド（３０）を反応させることによって化合物（９ｃ）を製造し、得られた化合物（９ｃ）の保護基P^7を除去することによって化合物（１０ｃ）を製造することができる。P^7に例示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法４で記載したアミノ基の保護基を挙げることができ、その保護基の除去に際しても保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（２９）と化合物（３０）との反応では、ペプチド合成に通常使用される反応試薬や条件を準用すればよい。上記の方法で製造した化合物（１０ｃ）は、上述の製造方法に従って本発明化合物（１）に導くことができる。

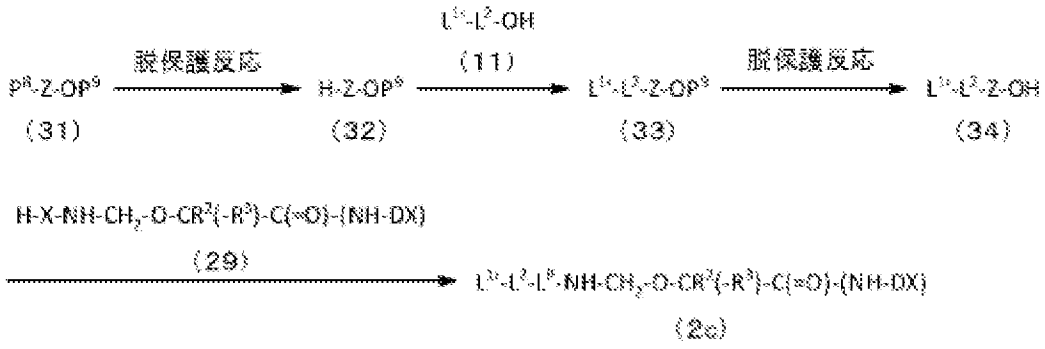
[0182] ８．製造方法８

以下に、製造方法４に記載の製造中間体（２）のうち、$n^1=1$、$L^6=0$、及び$L^5=CR^2(-R^3)$の化合物（２ｃ）の製造方法について詳述する。式（２ｃ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法で製造することができる。

[0183]

OnCusp
Ex. 1002

[化64]



[0184] [式中、L^1、L^2、L^P、R^2、及びR^3は前記と同じものを示し、Zは１から３個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを、P^8はアミノ基の保護基を、P^9はカルボキシ基の保護基を示す。]

[0185] 末端アミノ基及びカルボキシ基が保護されたアミノ酸又はオリゴペプチド（３１）の保護基P^8を除去することによって化合物（３２）を製造し、得られたアミン体（３２）と化合物（１１）を反応させることによって化合物（３３）を製造できる。P^8に例示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法４で記載したアミノ基の保護基を挙げることができる。また、保護基P^8の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（３２）とカルボン酸（１１）との反応では、製造方法４で述べた試薬や反応条件と同様なものを用いればよい。

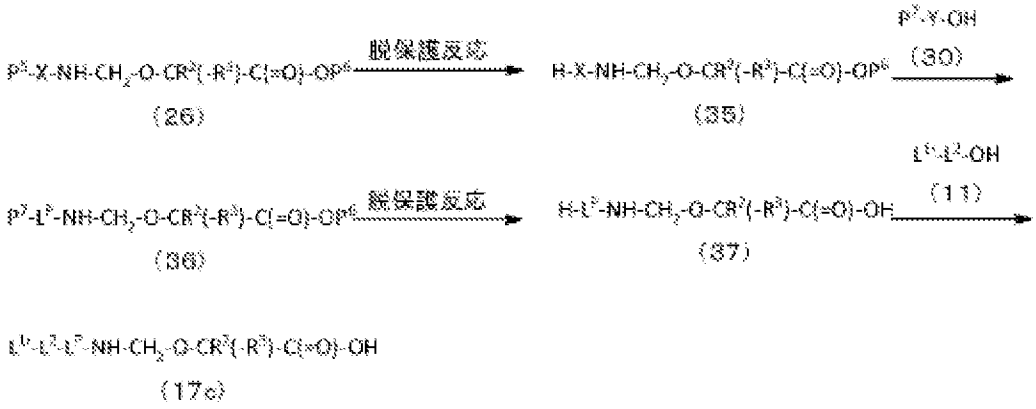
化合物（３３）の保護基P^9を除去することによって化合物（３４）を製造し、得られたカルボン酸（３４）と化合物（２９）を反応させることによって製造中間体（２ｃ）を製造した。P^9として例示されるカルボキシ基の保護基としては、代表的なものを製造方法４に記載したが、その脱保護反応では製造方法４で述べた試薬や反応条件と同様なものを用いればよい。また、化合物（２９）とカルボン酸（３４）との反応では、ペプチド合成に通常使用される反応試薬や条件を準用すればよい。上記の方法で製造した化合物（２ｃ）は、上述の製造方法に従って本発明化合物（１）に導くことができる。

[0186] ９．製造方法９

OnCusp
Ex. 1002

以下に、製造方法４に記載の製造中間体（１７）のうち、n^1=1、L^a=0、及びL^b=CR^2(-R^3)の化合物（１７ｃ）の製造方法について詳述する。式（１７ｃ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法によっても製造することができる。

[0187] [化65]



[0188] ［式中、L^1、L^2、L^P、R^2、R^3、X、Y、P^5、P^6、及びP^7は前記と同じものを示す。］

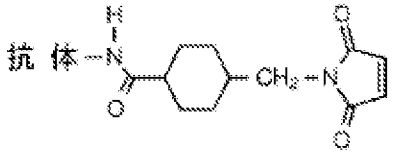
[0189] 末端アミノ基及び末端カルボキシ基が保護された化合物（２６）のアミノ基の保護基P^6を脱保護することによって化合物（３５）を製造し、得られたアミン体（３５）と末端アミノ基又はアミノ基が保護されたオリゴペプチド（３０）を反応させることによって化合物（３６）を製造できる。P^6に例示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法４で記載したアミノ基の保護基を挙げることができる。また、保護基P^6の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。ここで、P^6に例示されるカルボキシ基の保護基およびP^7に例示されるアミノ基の保護基としては、代表的なものとして製造方法４で記載したカルボキシ基およびアミノ基の保護基を挙げることができるが、カルボキシ基の保護基P^6とアミノ基の保護基P^7が同じ方法または条件で除去できる保護基が望ましい。例えばP^6がベンジルエステル基であり、P^7がベンジルオキシカルボニル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。

化合物（３７）は化合物（３６）のカルボキシ基の保護基P^6とアミノ基の保護基P^7を除去することによって製造することができる。カルボキシ基の保護基P^6とアミノ基の保護基P^7それぞれを順次除去することによっても化合物（３７）を製造することができるし、P^6とP^7が同じ方法または条件で除去できる保護基であれば、両者を一工程で除去して化合物（３７）を製造することができる。

得られた化合物（３７）と化合物（１１）を反応させることによって化合物（１７ｃ）を製造できる。化合物（３７）と化合物（１１）との反応では、製造方法４で述べた試薬や反応条件と同様なものを用いればよい。

[0190] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートの製造において有用な製造中間体として次式：

[0191] [化66]



[0192] で示される化合物を先に説明したが、さらに次式：

$Q-(CH_2)n^0-C(=O)-L^{2-5}-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

で示される一群の化合物も本発明の抗体－薬物コンジュゲートの製造において有用な製造中間体となる化合物である。

すなわち、上記式において，Ｑは、(maleimid-N-yl)-、HS-、$X-CH_2-C(=O)-NH-$、又は(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-であり、

Ｘは、臭素原子又はヨウ素原子であり、

n^0は、整数の２から８であり、

L^{2-5}は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$、又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^aは、$-C(=O)-NH-$、$-NR^3-(CH_2)n^7-$、$-O-$、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-COOH$、又は$-(CH_2)n^9-OH$を示すが、n^8は、整数の１から４を示し、n^9は、１から６の整数を示し、

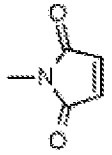
L^5は、$-CR^2(-R^3)-$、$-O-$、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^5-NH_2$、$-(CH_2)n^6-COOH$、又は$-(CH_2)n^7-OH$を示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^5は、０から６の整数を示し、n^6は、整数の１から４を示し、n^7は、整数の１から４を示すが、n^5が０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

L^6は、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

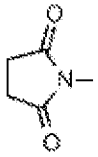
(maleimid-N-yl)-は、次式

[0193] [化67]



[0194] で示される構造の基（窒素原子が結合部位）であり、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

[0195] [化68]

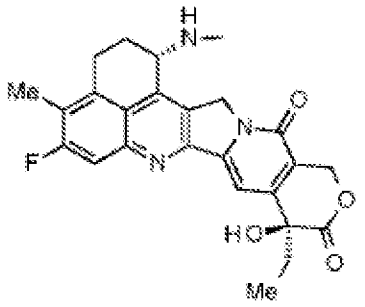


[0196] で示される構造の基（窒素原子が結合部位）であり、-(NH-DX)は、次式

[0197]

OnCusp
Ex. 1002

[化69]



[0198] で示される構造の基（１位のアミノ基の窒素原子が結合部位）である。

[0199] 製造中間体としては、L^cが-C(=O)-である化合物が好ましい。

また、L^pのペプチド残基としては、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるアミノ酸残基である化合物が製造中間体として好ましい。このようなペプチド残基のうち、L^pが４個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。より具体的には、L^pが-GGFG-である化合物が製造中間体として好ましい。

さらに、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-としては、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましく、より好ましくは、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(=O)-である化合物である。

n^0としては、整数の２から６である化合物が製造中間体として好ましい。

L^{2a}は、単結合であるか、n^6が整数の２から４の化合物が製造中間体として好ましい。

[0200] また、Qが、(maleimid-N-yl)-である場合、n^0が、整数の２から５であり、L^{2a}が単結合であり、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物である。さらに、n^0が、整数の２又は５である化合物が好

ましい。

[0201] さらに、Qが、(maleimid-N-yl)-である場合、n^6が、整数の２から５であり、L^{2a}が-NH-$(CH_2-CH_2-O)n^5$-CH_2-CH_2-C(=O)-であって、n^5が整数の２から４であり、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、n^6が整数の２又は４の化合物である。さらに、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が好ましい。

[0202] Qが、HS-である場合、n^6が、整数の２から５であり、L^{2a}が単結合であり、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物である。

[0203] Qが、X-CH_2-C(=O)-NH-である場合、Xとしては臭素原子である化合物が製造中間体として好ましい化合物である。n^6は、整数の２から８である化合物が好ましく、L^{2a}が単結合である化合物が好ましく、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましい。

[0204] Qが、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-である場合、n^6が、整数の２から５であり、L^{2a}が単結合であり、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-が、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物である。

[0205] より具体的には以下のものが製造中間体として好ましい化合物である。

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

Br-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

[0206] なお、本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、大気中に放置したり、又は再結晶することにより、水分を吸収し、吸着水がついたり、水和物になる場合が有り、そのような水を含む化合物及び塩も本発明に包含される。

また、本発明には、種々の放射性または非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の抗体－薬物コンジュゲートを構成する原子の1以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位体としては、例えば、重水素（^{2}H）、トリチウム（^{3}H）、ヨウ素－125（^{125}I）または炭素－14（^{14}C）等を挙げることができる。また、本発明化合物は、例えば、トリチウム（^{3}H）、ヨウ素－125（^{125}I）または炭素－14（^{14}C）のような放射性同位体で放射性標識され得る。放射性標識された化合物は、治療または予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。本発明の抗体－薬物コンジュゲートの全ての同位体変

OnCusp
Ex. 1002

異種は、放射性であると否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

[0207] <医薬>

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことから、医薬として、特に癌に対する治療剤及び／又は予防剤として使用することができる。

[0208] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートが適用される癌の種類としては、肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌等を挙げることができるが、治療対象となる癌細胞において抗体－薬物コンジュゲート中の抗体が認識できるタンパクを発現しているがん細胞であればこれらには限定されることはない。

[0209] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、より好ましくはヒトである。

[0210] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。

[0211] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、１種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、１種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水および油（石油、動物、植物、または合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など）を含む））を含む。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはｐＨ緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載される。その処方は、投与

の態様に対応する。

[0212] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗体－薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入またはボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記リガンド薬物結合体の投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。

[0213] 代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、（例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水の濃縮物として、別個に、または単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬が注入によって投与される予定である場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水または食塩水を含む注入ボトルで投薬され得る。上記医薬が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。

[0214] 本発明の医薬組成物には本願の抗体－薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいし、抗体－薬物コンジュゲート及び少なくとも一つのこれ以外の癌治療剤を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、他の癌治療剤と共に投与することもでき、これによって抗癌効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗癌剤は、抗体－薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このような癌治療剤として、ａｂｒａｘａｎｅ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ｃｉｓｐｌａｔｉｎ、ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ、ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ（ＣＰＴ

－１１）、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ、ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ又は国際公開第ＷＯ２００３／０３８０４３号パンフレットに記載の薬剤、更にＬＨ－ＲＨアナログ（リュープロレリン、ゴセレリン等）、エストラムスチン・フォスフェイト、エストロジェン拮抗薬（タモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。

[0215] このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

[0216] 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗体－薬物コンジュゲートは、抗体－薬物コンジュゲートの抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数（Ｋｄ値）の点において、親和性が高い（Ｋｄ値が低い）ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体－薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体－薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体－薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約０．００１～１００ｍｇ／ｋｇを１回あるいは１～１８０日間に１回の間隔で複数回投与すればよい。

実施例

[0217] 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。

[0218] 参考例１　Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体

抗Ｂ７－Ｈ３抗体のヒト化抗体のうち、配列番号９においてアミノ酸番号２０乃至４７１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号１６においてアミノ酸番号２１乃至２３３に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体を公知の方法によって製造し、得られたヒト化抗Ｂ７－Ｈ３抗体をＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体（又は単に「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４」と記載）とした。

[0219] 参考例２　Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体

上記で得られたＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体に結合している糖鎖修飾を公知の方法によって脱フコース化して調節し、得られた糖鎖修飾が調節されている抗体をＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体（又は単に「Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ」と記載）とした。

[0220] 参考例３　抗ＣＤ３０抗体

抗ＣＤ３０抗体は特表２００５－５０６０３５を参照して作製した。その配列を配列番号２７、２８に示した。

[0221] 参考例４　抗ＣＤ３３抗体

抗ＣＤ３３抗体は特開平８－４８６３７号を参照して作製した。その配列を配列番号２９，３０示した。

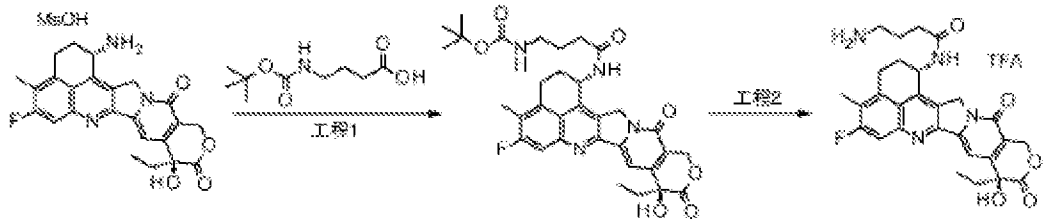
[0222] 参考例５　抗ＣＤ７０抗体

抗ＣＤ７０抗体は特表２００８－５３８２９２を参照して作製した。その配列を配列番号３１，３２に示した。

[0223] 実施例１　４－アミノ－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］ブタンアミド

[0224]

[化70]



[0225] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）カーバメート

４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸（０．２３７ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１３０ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）及び、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．２１６ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。その反応溶液を化合物（４）のメシル酸塩（０．５００ｇ、０．９４ｍｍｏＬ）及び、トリエチルアミン（０．１５７ｍＬ、１．１３ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１０ｍＬ）に滴下し、室温にて一日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．５９５ｇ、定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３１（９Ｈ，ｓ），１．５８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．６６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．８２－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２１（３Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．９２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｓ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５９－５．５５（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ

，ｓ），６．７８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６２１（Ｍ＋Ｈ）＋

[0226] 工程２：４－アミノ－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］ブタンアミド

上記工程１で得た化合物（０．３８８ｇ、０．６１ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（９ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（９ｍＬ）を加え４時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（０．３４３ｇ、定量的）を得た。抗体－薬物コンジュゲート（１３）、（１４）を担癌マウスに投与した際に、この化合物が腫瘍中で確認された。

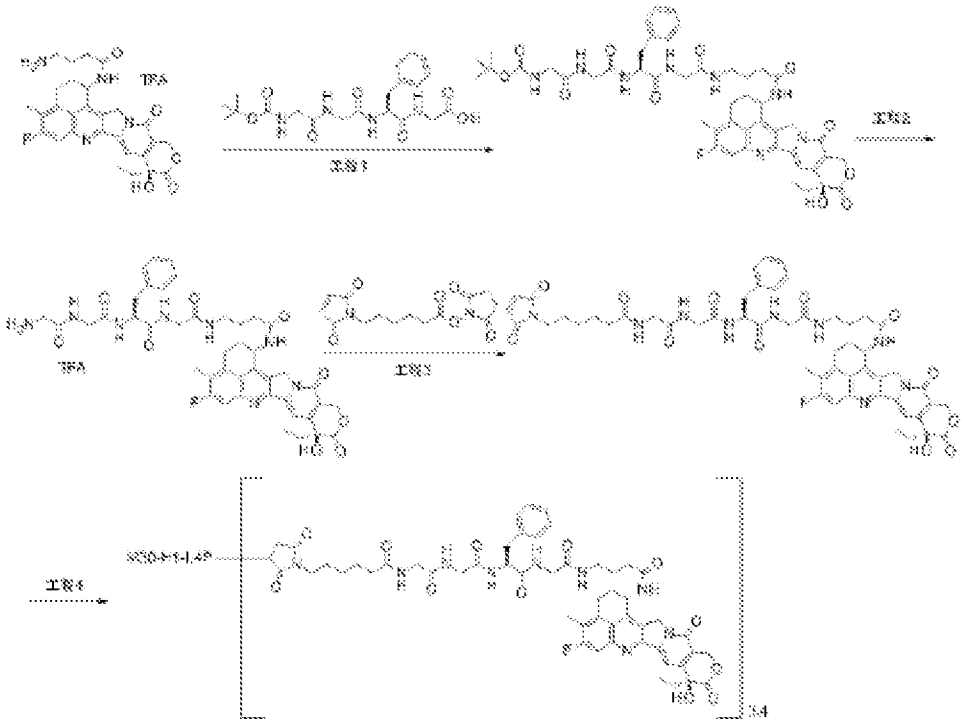
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．７９－１．９２（４Ｈ，ｍ），２．１０－２．１７（２Ｈ，ｍ），２．２７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．８０－２．８６（２Ｈ，ｍ），３．１５－３．２０（２Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７２（３Ｈ，ｂｒｓ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５２１（Ｍ＋Ｈ）＋

[0227] 実施例２　抗体－薬物コンジュゲート（１）

[0228]

[化71]



[0229] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシン（０．０８１ｇ、０．１９ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（３ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．０２１ｇ、０．１９ｍｍｏＬ）及び、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．０３６ｇ、０．１９ｍｍｏＬ）を加え３．５時間撹拌した。その反応溶液を実施例１の化合物（０．０８０ｇ、０．１５ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１．５ｍＬ）に滴下し、室温にて４時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲル

OnCusp
Ex. 1002

カラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．１０６ｇ、７３％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．３６（９Ｈ，ｓ），１．７１（２Ｈ，ｍ），１．８６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），２．１５－２．１９（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１２．７，８．８Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，４．７Ｈｚ），３．０８－３．１１（２Ｈ，ｍ），３．１６－３．１９（２Ｈ，ｍ），３．５４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），３．５７－３．７７（４Ｈ，ｍ），４．４６－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．００（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．１７－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９３９（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0230] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程１で得た化合物（１．９７ｇ、２．１０ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（７ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（７ｍＬ）を加え１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、トルエンを加えて共沸し、得られた残留物をシリ

カゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（１．９７ｇ、９９％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７１－１．７３（２Ｈ，ｍ），１．８２－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２０（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．４Ｈｚ），３．０３－３．０９（３Ｈ，ｍ），３．１８－３．１９（２Ｈ，ｍ），３．５８－３．６０（２Ｈ，ｍ），３．６４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），３．６９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），３．７２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），３．８７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．８，５．９Ｈｚ），４．５０－４．５６（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），７．１７－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７８－７．８１（２Ｈ，ｍ），７．９５－７．９７（３Ｈ，ｍ），８．３３－８．３５（２Ｈ，ｍ），８．４８－８．５１（２Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：８３９（Ｍ＋Ｈ）＋

[0231] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（３３７ｍｇ，０．３５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．２ｍＬ）溶液に、トリエチルアミン（４４．３ｍＬ，０．３１８ｍｍｏＬ）、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（１１９．７ｍｇ，０．３８８ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間撹拌し

た。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝５：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（２７８．０ｍｇ，７６％）を淡黄色固体として得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．１２－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．６６－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．２１（６Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．０，９．８Ｈｚ），２．９８－３．２１（５Ｈ，ｍ），３．５５－３．７７（８Ｈ，ｍ），４．４１－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．１Ｈｚ），５．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．１Ｈｚ），５．５４－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．２０－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ）．
ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０３２（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0232] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（１）
抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２５ｍＬ；抗体一分子に対して３．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内

であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．１０９ｍＬ）と上記工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０３９ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００８ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

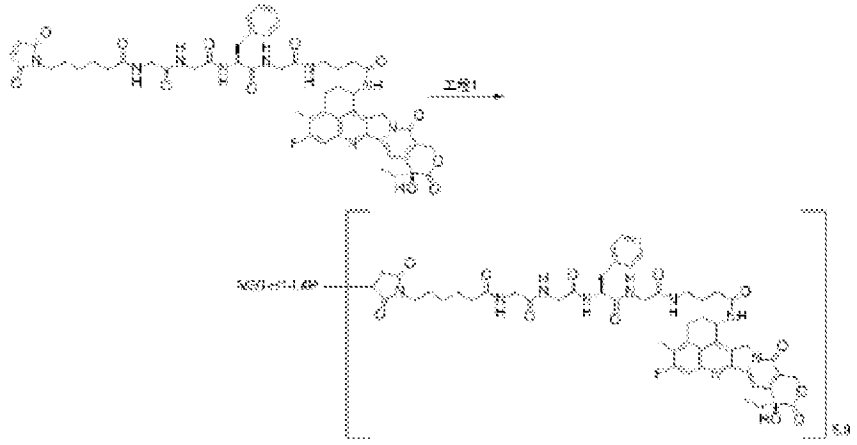
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値），$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値），$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値），$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１３．０２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．１ｍｇ（７３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0233] 実施例３　抗体－薬物コンジュゲート（２）

[0234] [化72]



[0235] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（４．０ｍＬ）を１５ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．１１８ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．２００ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．２３６ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００４７１ｍＬ）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

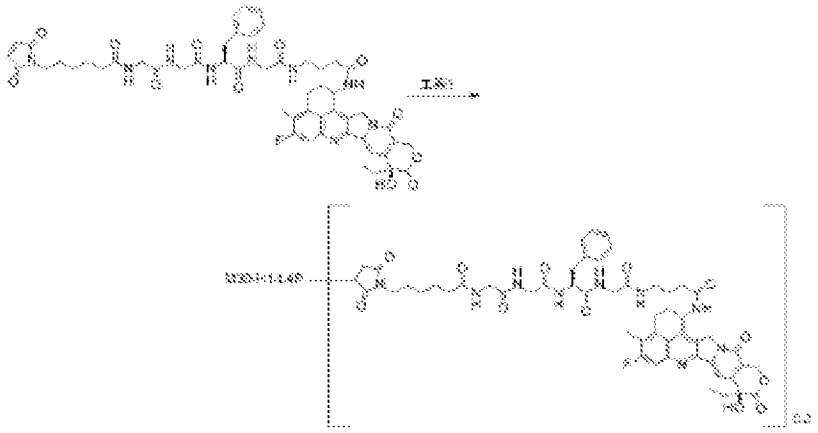
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を１７．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．８０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２６．１ｍｇ（６５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．９

[0236] 実施例４　抗体－薬物コンジュゲート（３）

[0237] [化73]



[0238] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液０．０５１ｍＬ（抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０６７ｍＬ）と実施例２の工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０８５ｍＬ；抗体一分子に対して１０．０当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下６０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１３ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

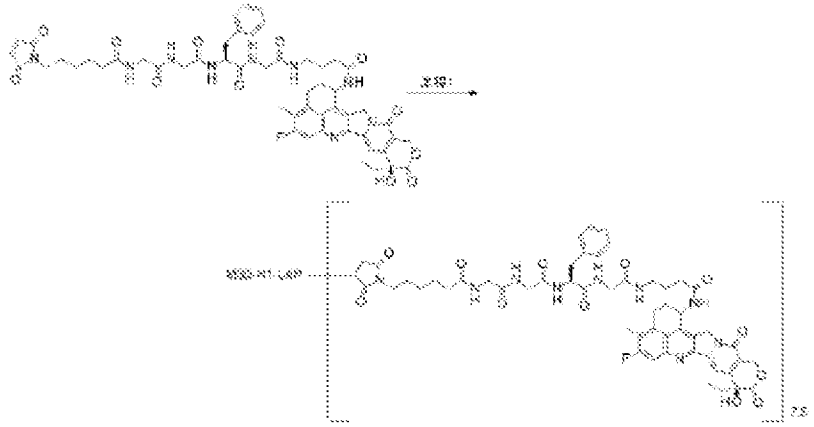
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．６７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．０２ｍｇ（８０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．３

[0239] 実施例５　抗体－薬物コンジュゲート（４）

[0240] [化74]



[0241] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬ$mg^{-1}cm^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０５１ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内

であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０２５ｍＬ）と実施例２の工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．１２７ｍＬ；抗体一分子に対して１５．０当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下６０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１９ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

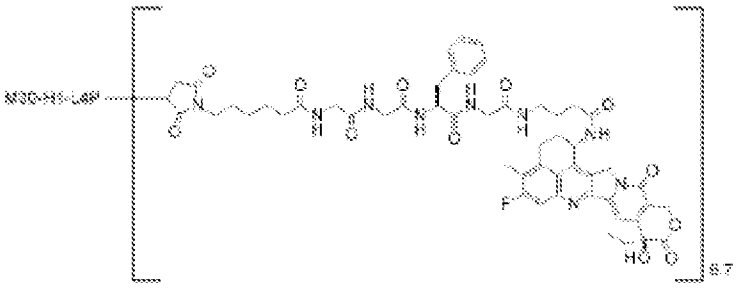
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値），$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値），$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値），$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．１４ｍｇ（５７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．５

[0242] 実施例６　抗体－薬物コンジュゲート（５）

[0243] [化75]

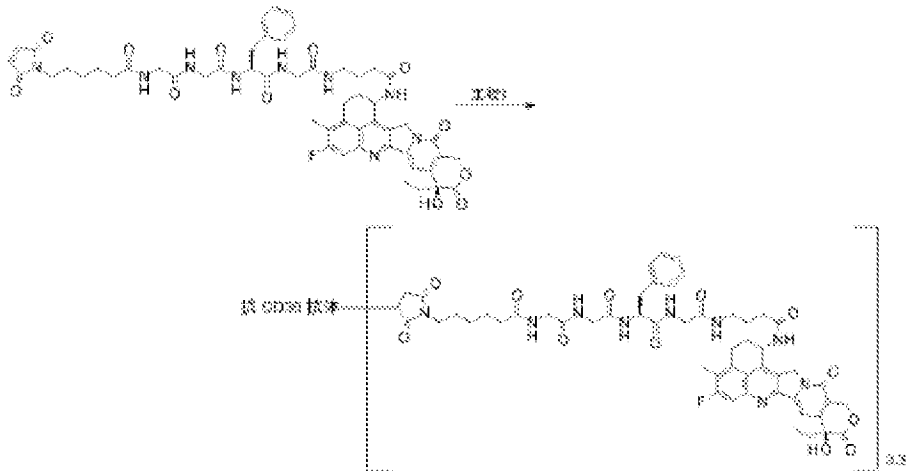


[0244] 実施例４と実施例５の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１５．３７ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．７

[0245] 実施例７　抗体－薬物コンジュゲート（６）

[0246] [化76]



[0247] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６）

抗体の還元：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液０．０２９７ｍＬ（抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物１０ｍＭジメチルスルホキシド溶液（０．０５９３ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１９ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、

さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

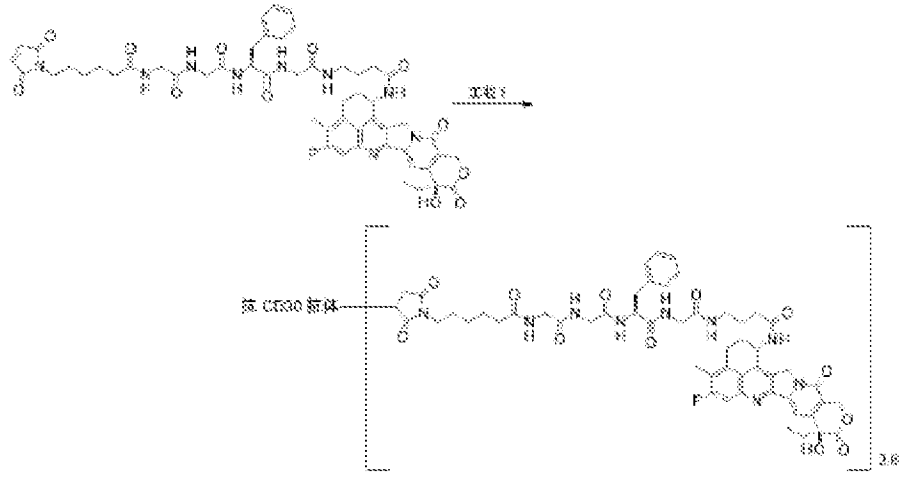
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．９４ｍｇ（５９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．３

[0248] 実施例８　抗体－薬物コンジュゲート（７）

[0249] [化77]



[0250] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（７）

抗体の還元：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、３０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１４８ｍＬ；抗体一分子に対して６．９当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎ

ｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物３０ｍＭジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；抗体一分子に対して１３．８当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１７８ｍＬ；抗体一分子に対して２７．６当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

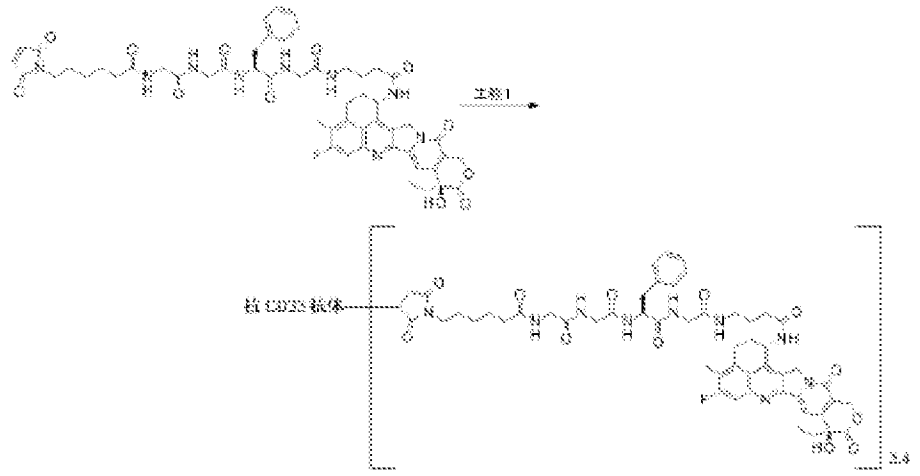
抗体濃度：０．９９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．９４ｍｇ（５９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．８

[0251] 実施例９　抗体－薬物コンジュゲート（８）

[0252]

OnCusp
Ex. 1002

[化78]



[0253] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（８）

抗体の還元：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２９７ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物１０ｍＭジメチルスルホキシド溶液（０．０５９３ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１９ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡ

OnCusp
Ex. 1002

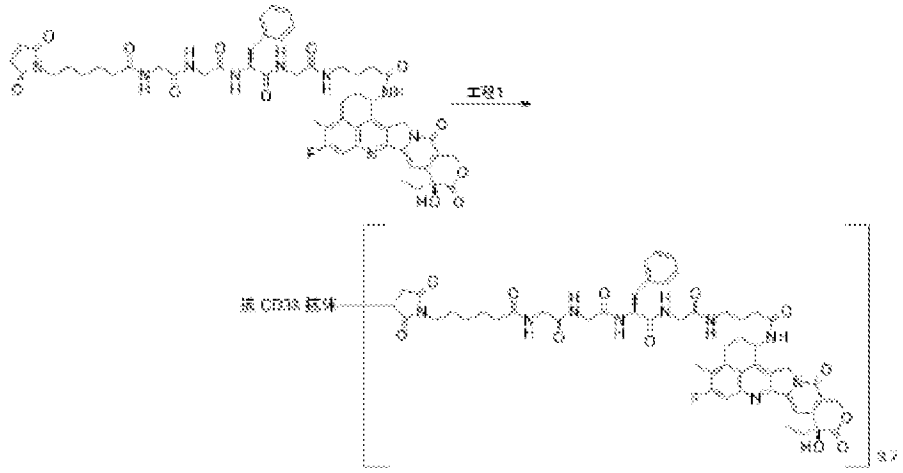
ＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．０６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．３６ｍｇ（６４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

〔0254〕実施例１０　抗体－薬物コンジュゲート（９）

〔0255〕[化79]



〔0256〕工程１：抗体－薬物コンジュゲート（９）

抗体の還元：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、３０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１４８ｍＬ；抗体一分子に対して６．９当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物３０ｍＭジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；抗体一分子に対して１３．８当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１７８ｍＬ；抗体一分子に対して２７．６当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

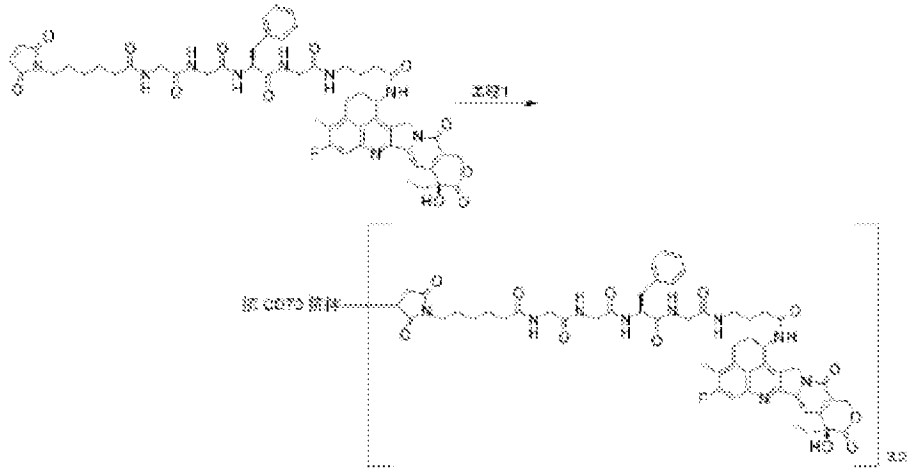
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．７０ｍｇ（５７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．７

[0257] 実施例１１　抗体－薬物コンジュゲート（１０）

[0258] [化89]



[0259] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１０）

抗体の還元：参考例５にて作製した抗ＣＤ７０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２９７ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物１０ｍＭジメチルスルホキシド溶液（０．０５９３ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１９ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

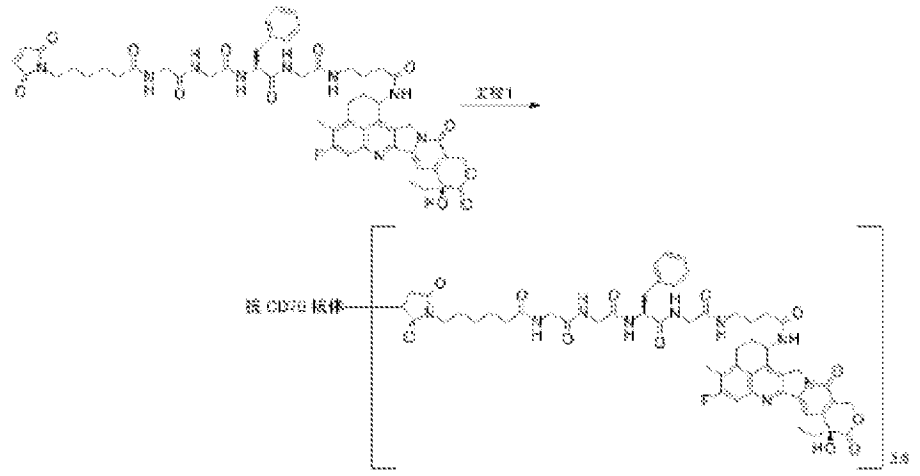
抗体濃度：１．００ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．００ｍｇ（６０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２

[0260] 実施例１２　抗体－薬物コンジュゲート（１１）

[0261]

OnCusp
Ex. 1002

[化81]



[0262] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１１）

抗体の還元：参考例５にて作製した抗ＣＤ７０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、３０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１４８ｍＬ；抗体一分子に対して６．９当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例２の工程３で得た化合物３０ｍＭジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；抗体一分子に対して１３．８当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１７８ｍＬ；抗体一分子に対して２７．６当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡ

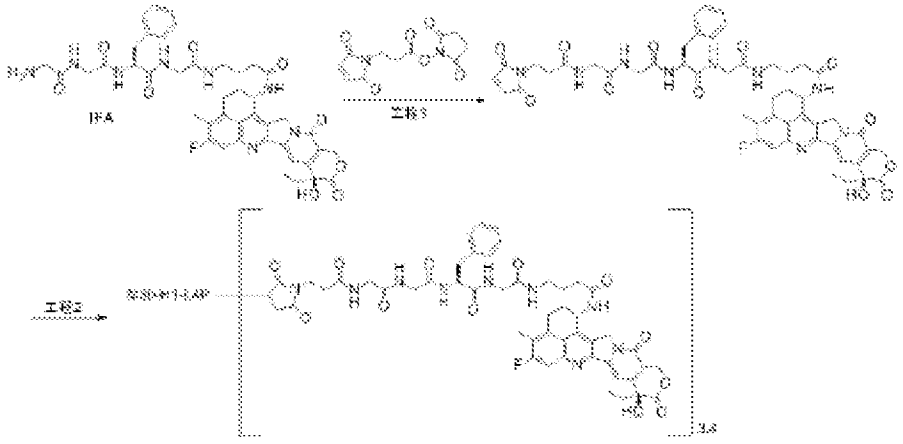
ＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．７６ｍｇ（５８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．６

[0263] 実施例１３　抗体－薬物コンジュゲート（１２）

[0264] [化82]



[0265] 工程１：Ｎ－［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－（［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２の工程２で得た化合物（８０ｍｇ，０．０８４ｍｍｏＬ）を，６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－マレイミドプロピオン酸Ｎ－スクシンイミジル（２４．６ｍｇ，０．０９２４ｍｍｏＬ）

を用いて、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（６０．０ｍｇ，７３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７０－１．７８（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．８１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０１－３．１５（３Ｈ，ｍ），３．１６－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．３０－３．３５（１Ｈ，ｍ），３．５８－３．７１（６Ｈ，ｍ），３．７１－３．７９（１Ｈ，ｍ），４．４４－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．０Ｈｚ），５．２７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．０Ｈｚ），５．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．６Ｈｚ），５．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．６Ｈｚ），５．５７－５．６３（１Ｈ，ｍ），６．５６（１Ｈ，ｓ），７．０２（２Ｈ，ｓ），７．１７－７．２２（１Ｈ，ｍ），７．２２－７．３０（５Ｈ，ｍ），７．３４（１Ｈ，ｓ），７．７３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．７Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．３０（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１８．７，５．７Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９９０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0266] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（１２）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例２の工程４と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

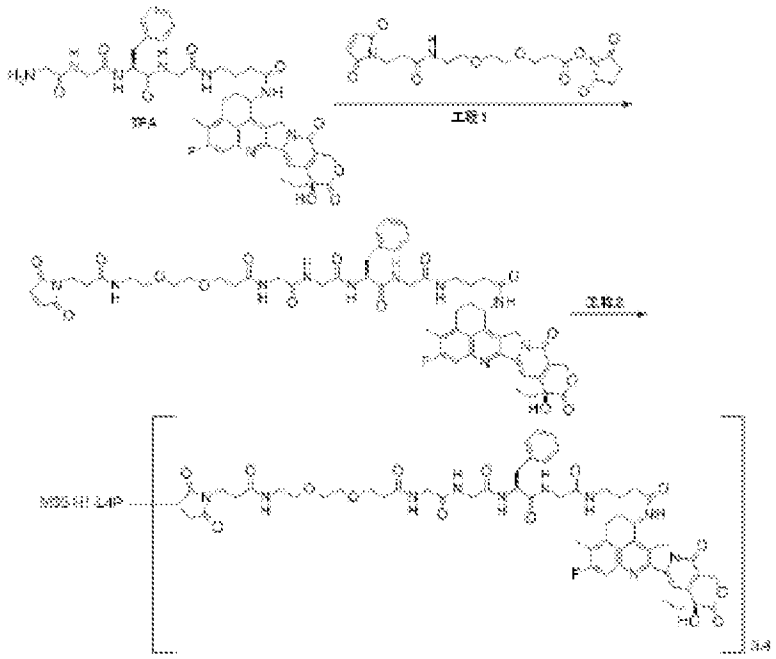
抗体濃度：１２．１６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．５ｍｇ（６８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0267] 実施例１４　抗体－薬物コンジュゲート（１３）

[0268]

OnCusp
Ex. 1002

[化83]



[0269] 工程１：Ｎ－｛３－［２－（２－｛［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］アミノ｝エトキシ）エトキシ］プロパノイル｝グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ）－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２の工程２で得た化合物（１００ｍｇ，０．１１９ｍｍｏＬ）を、トリエチルアミンの代わりにジイソプロピルエチルアミン（２０．８μＬ，０．１１９ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－（２－（２－（３－マレインイミドプロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパン酸Ｎ－スクシンイミジル（５０．７ｍｇ，０．１１９ｍｍｏＬ）を用いて、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（６６．５ｍｇ，４８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}H－NMR（４００MHz，DMSO－d_6）δ：０．８５（３H，t，J＝７．４Hz），１．６５－１．７４（２H，m），１．７７－１．９０（２H，m），２．０７－２．１９（４H，m），２．３０（２H，t，J＝７．２Hz），２．３３－２．３６（２H，m），２．３８（３H，s），２．７６（１H，dd，J＝１３．７，９．８Hz），２．９６－３．１８（９H，m），３．４２－３．４４（４H，m），３．５３－３．７６（１０H，m），４．４３（１H，td，J＝８．６，４．７Hz），５．１４（１H，d，J＝１８．８Hz），５．２３（１H，d，J＝１８．８Hz），５．３８（１H，d，J＝１７．２Hz），５．４２（１H，d，J＝１７．２Hz），５．５２－５．５８（１H，m），６．５２（１H，s），６．９８（２H，s），７．１２－７．１７（１H，m），７．１８－７．２５（４H，m），７．２９（１H，s），７．６９（１H，t，J＝５．５Hz），７．７８（１H，d，J＝１１．３Hz），７．９８－８．０３（２H，m），８．１１（１H，d，J＝７．８Hz），８．１６（１H，t，J＝５．７Hz），８．２３（１H，t，J＝５．９Hz），８．４４（１H，d，J＝９．０Hz）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）m／z：１１４９（M＋H）＋

[0270] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（１３）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例２の工程４と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

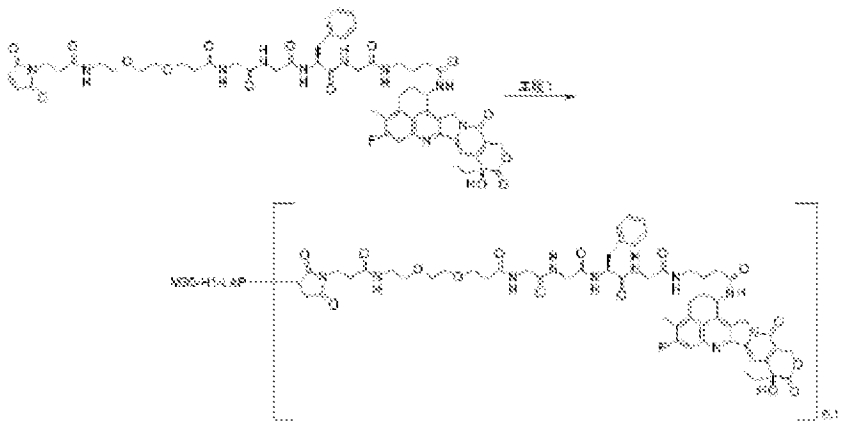
抗体濃度：１２．７６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．９ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0271] 実施例１５　抗体－薬物コンジュゲート（１４）

[0272]

OnCusp
Ex. 1002

[化84]



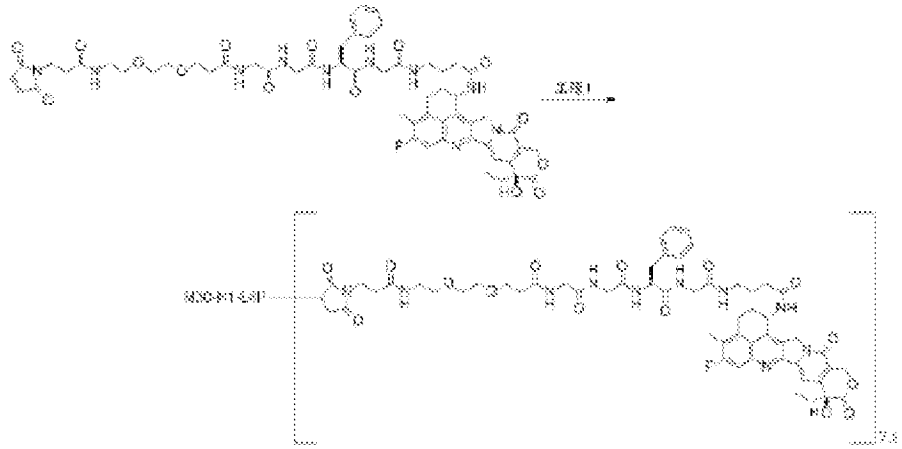
[0273] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１４）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例１４の工程１で得た化合物を用いて、実施例４の工程１と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．６０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．６０ｍｇ（７７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．１

[0274] 実施例１６　抗体－薬物コンジュゲート（１５）

[0275] [化85]



[0276] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１５）

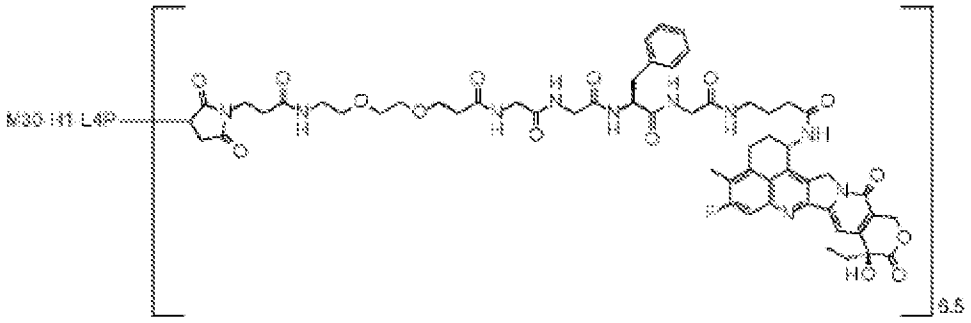
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例１４の工程１で得た化合物を用いて、実施例５の工程１と同様の方法によって、標記抗体

一薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．６４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．８４ｍｇ（７９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．１

[0277] 実施例１７　抗体－薬物コンジュゲート（１６）

[0278] [化86]

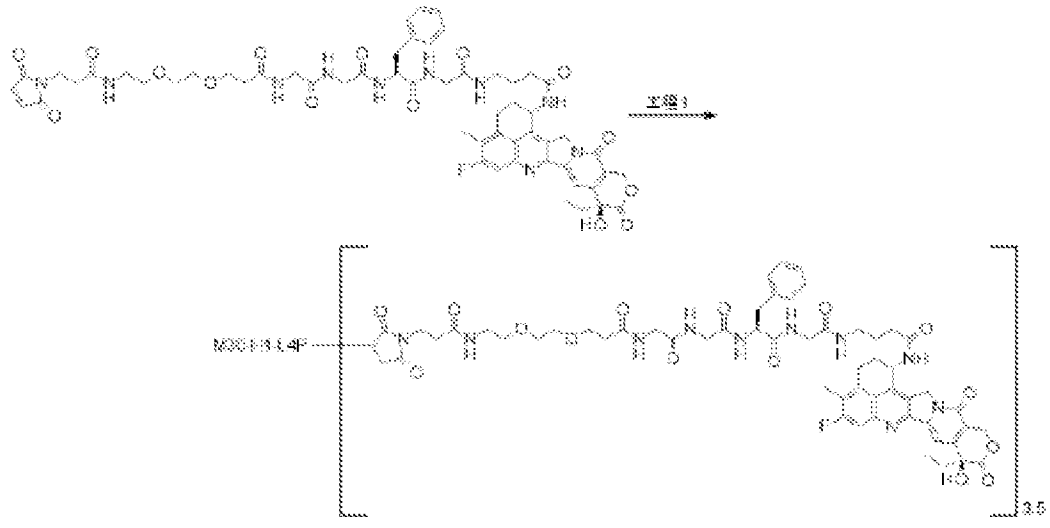


[0279] 実施例１５と実施例１６の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１７．３０ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．５

[0280] 実施例１８　抗体－薬物コンジュゲート（１７）

[0281] [化87]



[0282] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１７）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１００ｍＬ、抗体１ｇ）を２５０ｍＬフラスコに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（２．４３ｍＬ；抗体一分子に対して３．６当量）を加え、さらに１Ｍ　リン酸水素二カリウム水溶液（５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４付近であることをｐＨメーターで確認した後、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（３．５１ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）及びジメチルスルホキシド（２．１４ｍＬ）を室温下加え、１５℃水浴中で撹拌子で１３０分撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．５４７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｂｉｏｍａｘ　５０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳを滴下しながら（計８００ｍＬ）、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を約７０ｍＬ得た。

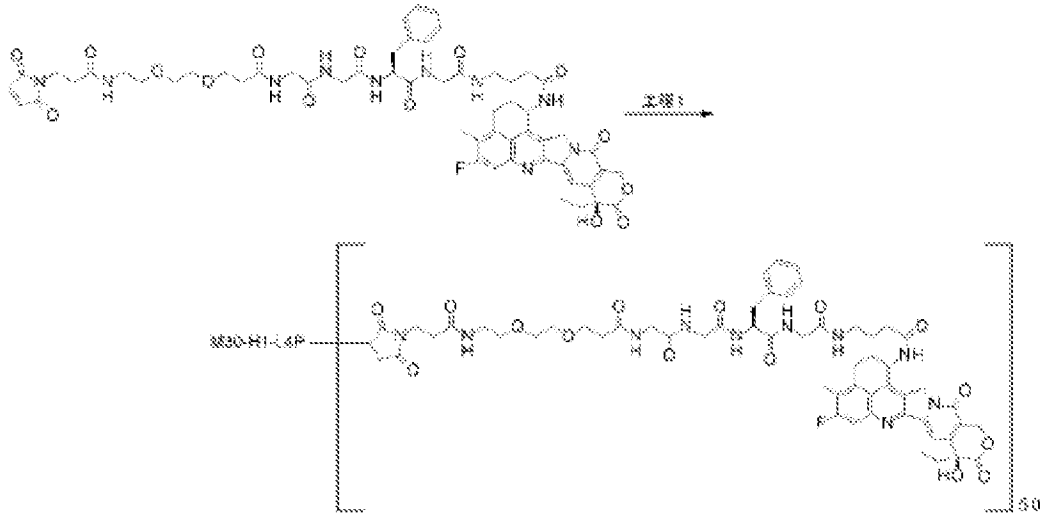
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４

９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１４．５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１．０ｇ（約１００％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．５

[0283] 実施例１９　抗体－薬物コンジュゲート（１８）

[0284] [化88]



[0285] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１８）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（５ｍＬ、抗体５０ｍｇ）を１５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．１３５ｍＬ；抗体一分子に対して４当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．４付近であることをｐＨメーターで確認した後、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．２１９ｍＬ；抗体一分子に対して６．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０６４ｍＬ）を加え、１５℃水浴中で９０分インキュベートし、薬物リンカ

ーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０３３ｍＬ；抗体一分子に対して９．８当量）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

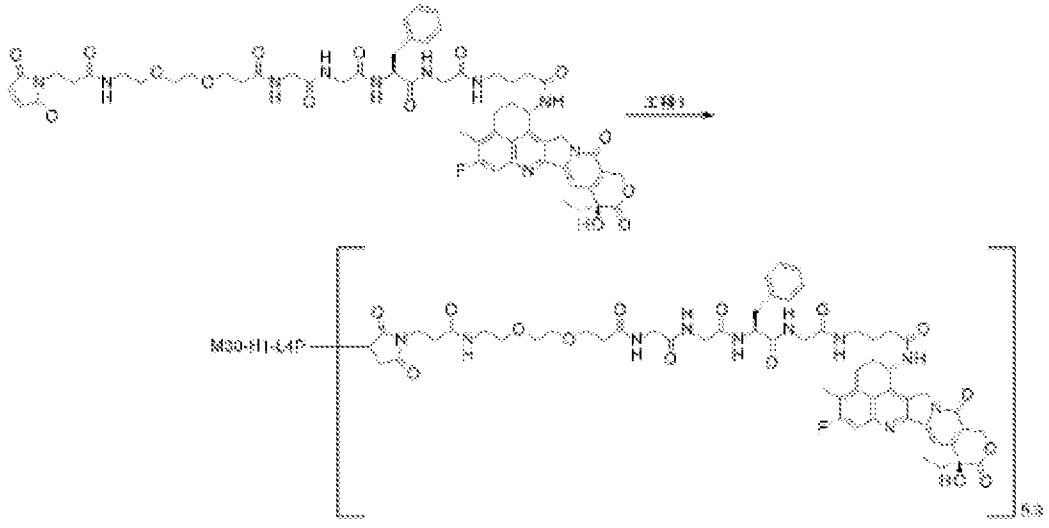
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体ー薬物コンジュゲートを含有する溶液を１９ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．１７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４１ｍｇ（８２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．０

[0286] 実施例２０　抗体ー薬物コンジュゲート（１９）

[0287] [化89]



[0288] 工程１：抗体ー薬物コンジュゲート（１９）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（４ｍＬ、抗体４０ｍｇ）を１５ｍＬチューブに入れ、

１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．１４０ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．４付近であることをｐＨメーターで確認した後、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．２３２ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）を加え、１５℃水浴中で９０分インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０３５ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を１３ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

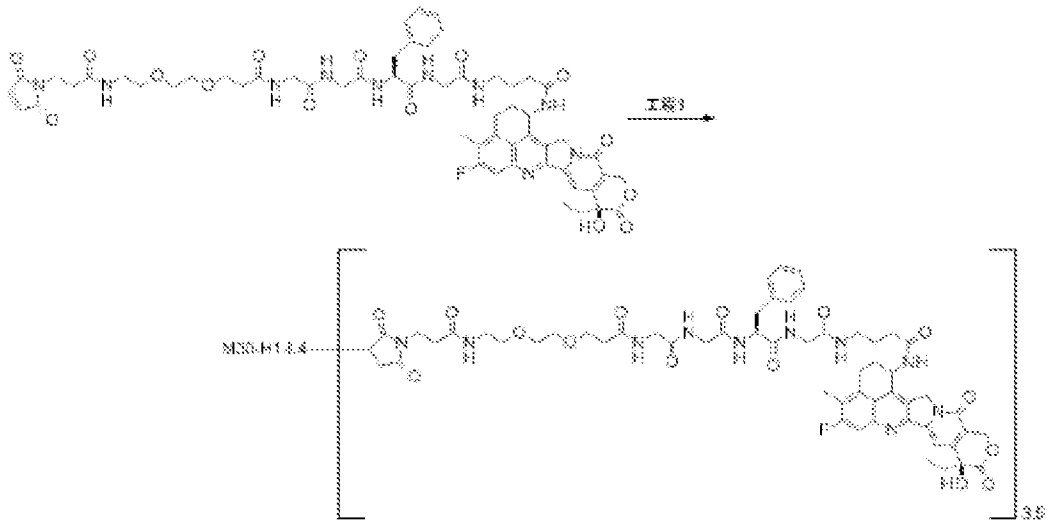
抗体濃度：２．３６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：３１ｍｇ（７７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．９

[0289] 実施例２１　抗体－薬物コンジュゲート（２０）

[0290]

OnCusp
Ex. 1002

[化80]



[0291] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２０）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．２５ｍＬ、抗体１２．５ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２８７ｍＬ；抗体一分子に対して３．４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０４３９ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）及びジメチルスルホキシド（０．０２６７ｍＬ）を室温下加え、１５℃の水浴中で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００６６ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させ

た。

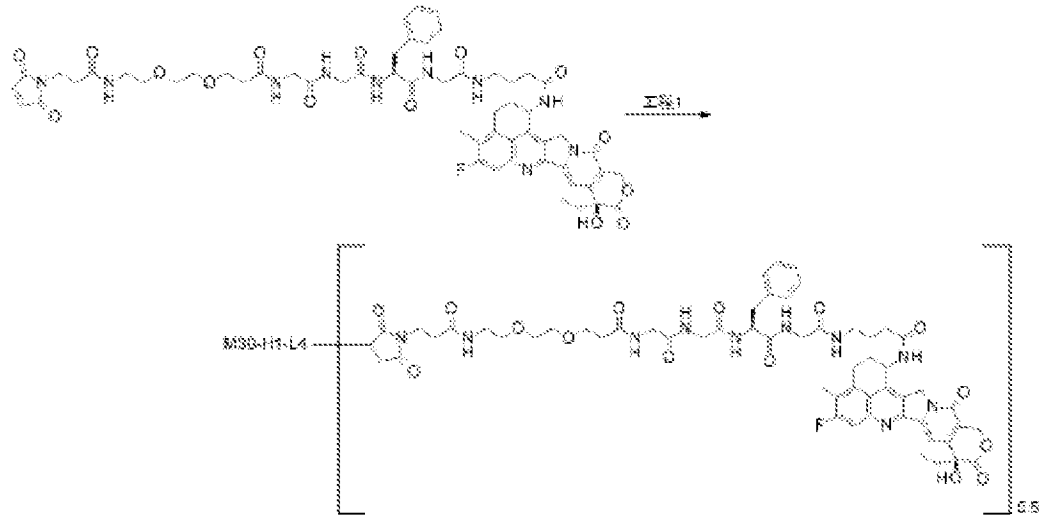
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．７ｍｇ（７０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．５

[0292] 実施例２２　抗体－薬物コンジュゲート（２１）

[0293] [化91]



[0294] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２１）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．２５ｍＬ、抗体１２．５ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０４３９ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）（０．０２８７ｍＬ；抗体一

分子に対して３．４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０７２６ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）を室温下加え、１５℃の水浴中で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

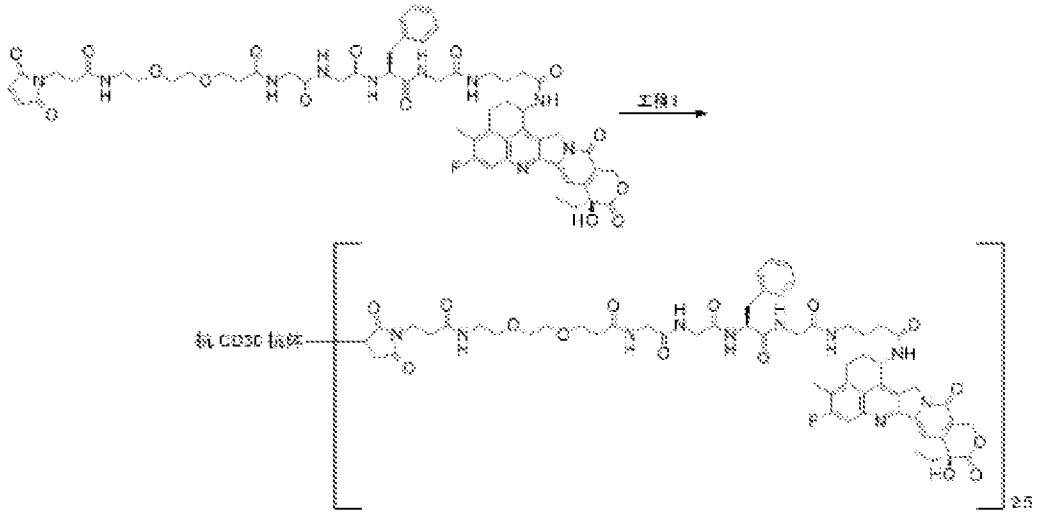
抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．３ｍｇ（６６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．５

[0295] 実施例２３　抗体－薬物コンジュゲート（２２）

[0296]

OnCusp
Ex. 1002

[化82]



[0297] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２２）

抗体の還元：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．００６５ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）を加え、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０１１６ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．００９８ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００１７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有す

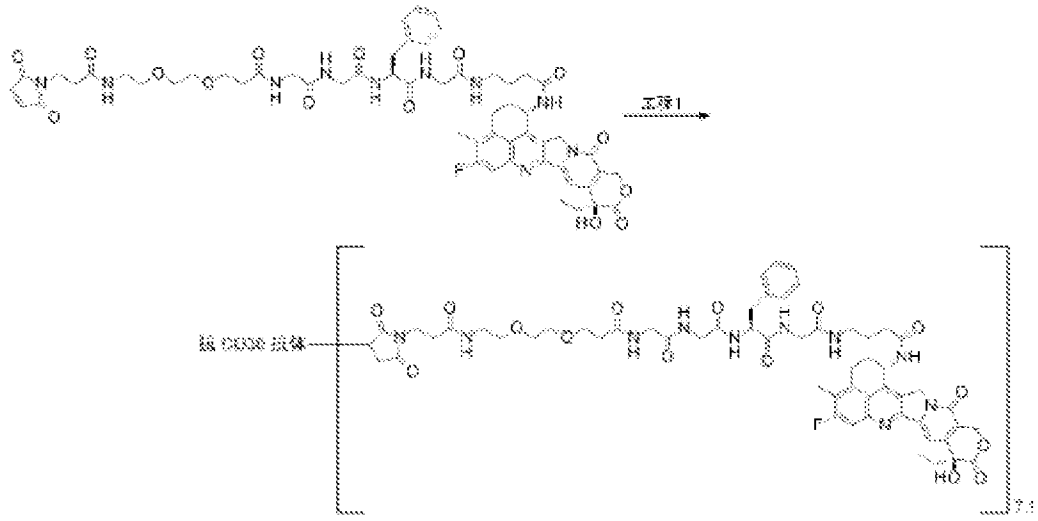
る溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．８６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．２ｍｇ（５４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．５

[0298] 実施例２４　抗体－薬物コンジュゲート（２３）

[0299] [化93]



[0300] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２３）

抗体の還元：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．３５ｍＬ、抗体３．５ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１１３ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）を加え、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２

OnCusp
Ex. 1002

０４ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）及びプロピレングリコール（関東化学株式会社、０．１８ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００３１ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

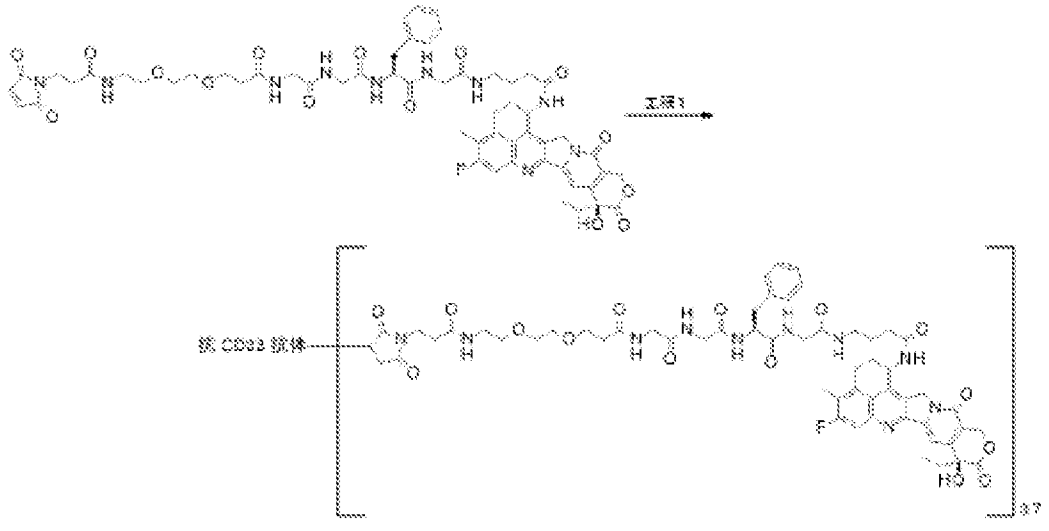
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．４１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１．０ｍｇ（２９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．１

[0301] 実施例２５　抗体－薬物コンジュゲート（２４）

[0302] [化94]



[0303] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２４）

抗体の還元：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、製造方法１に記載し

た共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．００６５ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００５８ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０１１６ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０１０１ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００１７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

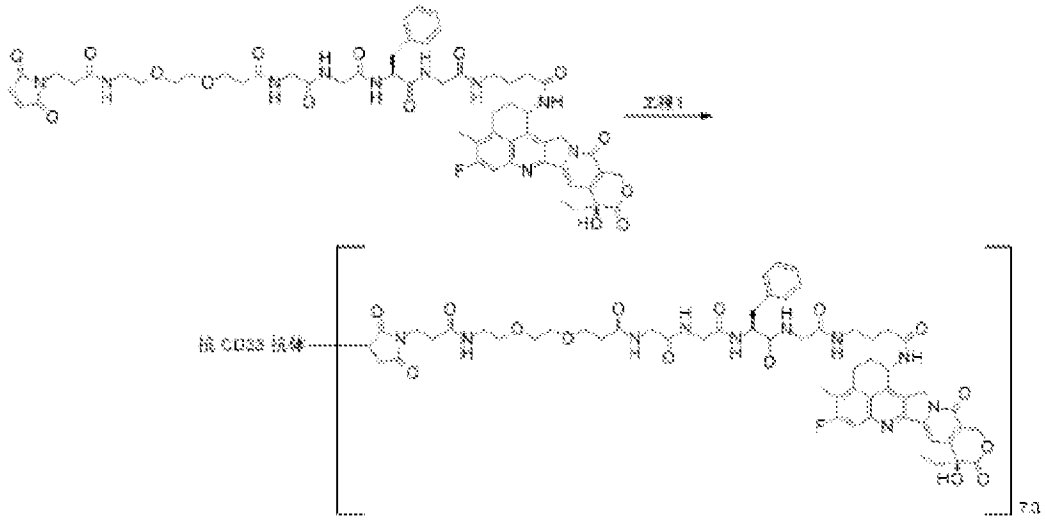
抗体濃度：１．２５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：３．１ｍｇ（７８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．７

[0304] 実施例２６　抗体－薬物コンジュゲート（２５）

[0305]

OnCusp
Ex. 1002

[化95]



[0306] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２５）

抗体の還元：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１２９ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００６ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２３３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００３５ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

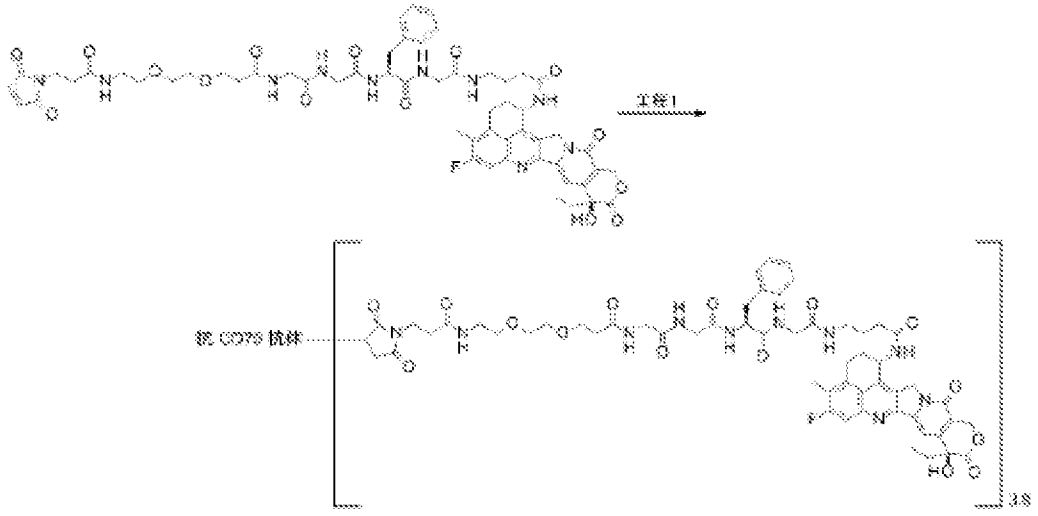
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．９ｍｇ（７３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．３

[0307] 実施例２７　抗体－薬物コンジュゲート（２６）

[0308] [化96]



[0309] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２６）

抗体の還元：参考例５にて作製した抗ＣＤ７０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．００６５ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００５８ｍＬ）を加えた。本溶

液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０１１６ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０１０１ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００１７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

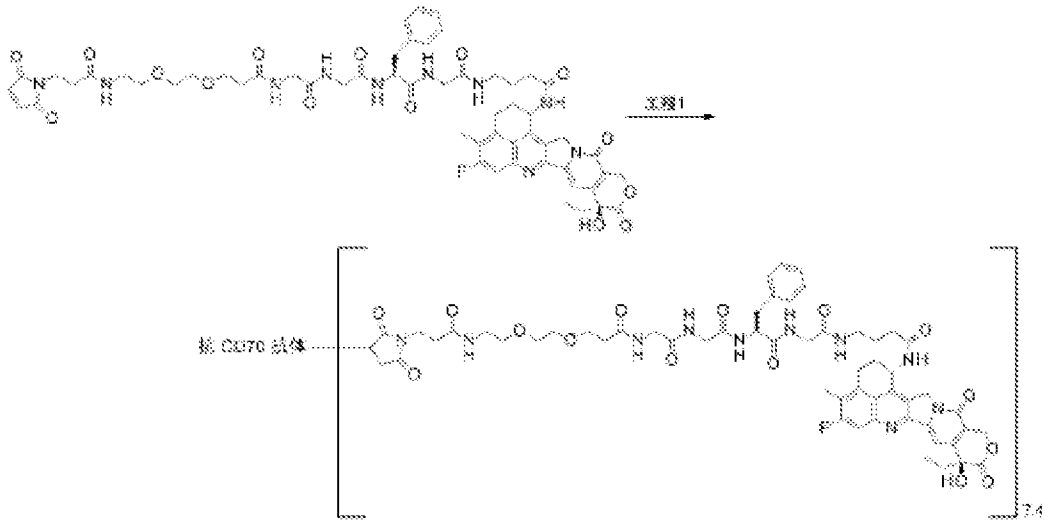
抗体濃度：１．１４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．９ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．８

[0310] 実施例２８　抗体－薬物コンジュゲート（２７）

[0311]

OnCusp
Ex. 1002

[化97]



[0312] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２７）

抗体の還元：参考例５にて作製した抗ＣＤ７０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１２９ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００６ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例１４の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２３３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００３５ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

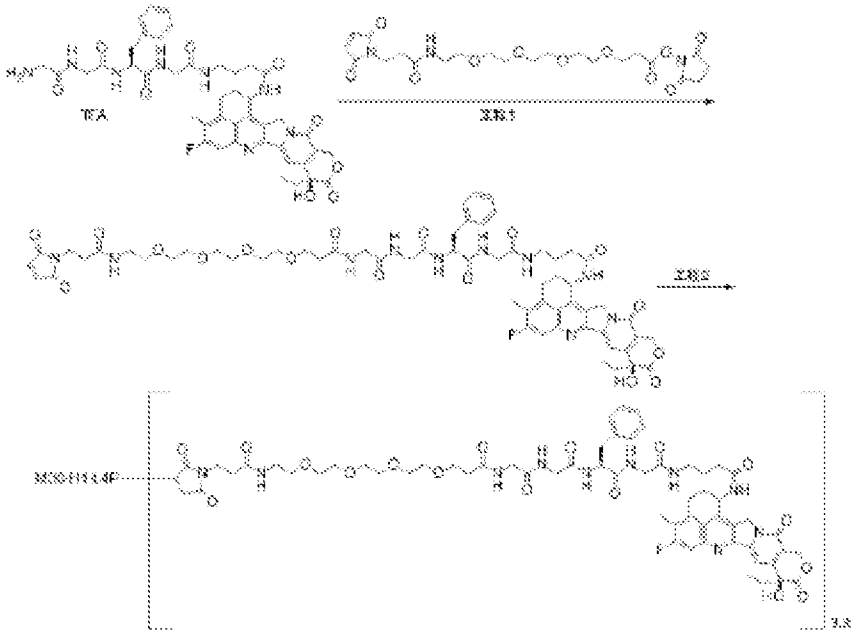
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝４９６４（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１８９８２（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．８ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．４

[0313] 実施例２９　抗体－薬物コンジュゲート（２８）

[0314] [化98]



[0315] 工程１：Ｎ－［１９－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１７－オキソ－４，７，１０，１３－テトラオキソ－１６－アザノナデカン－１－オイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６

，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２の工程２で得た化合物（９０ｍｇ，０．１０７ｍｍｏＬ）を、トリエチルアミンの代わりにジイソプロピルエチルアミン（１８．７μＬ，０．１０７ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに１－マレインイミド－３－オキソ－７，１０，１３，１６－テトラオキサ－４－アザノナデカン－１９－酸Ｎ－スクシンイミジル（５５．１ｍｇ，０．１０７ｍｍｏＬ）を用いて、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（５０ｍｇ，３７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８５（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．６４－１．７４（２Ｈ，ｍ），１．７７－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．１９（４Ｈ，ｍ），２．２７－２．３２（２Ｈ，ｍ），２．３３－２．３７（２Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），２．７２－２．８０（３Ｈ，ｍ），２．９６－３．１９（６Ｈ，ｍ），３．３９－３．４８（１０Ｈ，ｍ），３．５２－３．７５（１０Ｈ，ｍ），４．３９－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．０Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．０Ｈｚ），５．５２－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），６．９８（１Ｈ，ｓ），７．１３－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．２９（１Ｈ，ｓ），７．６９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９８－８．０３（２Ｈ，ｍ），８．１０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１２３７（Ｍ＋Ｈ）$^+$

〔0316〕工程２：抗体－薬物コンジュゲート（２８）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＳ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍ

Ｌｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２５ｍＬ；抗体一分子に対して３．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．１０２ｍＬ）と上記工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０４７ｍＬ；抗体一分子に対して５．５当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００９）ｍＬを加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

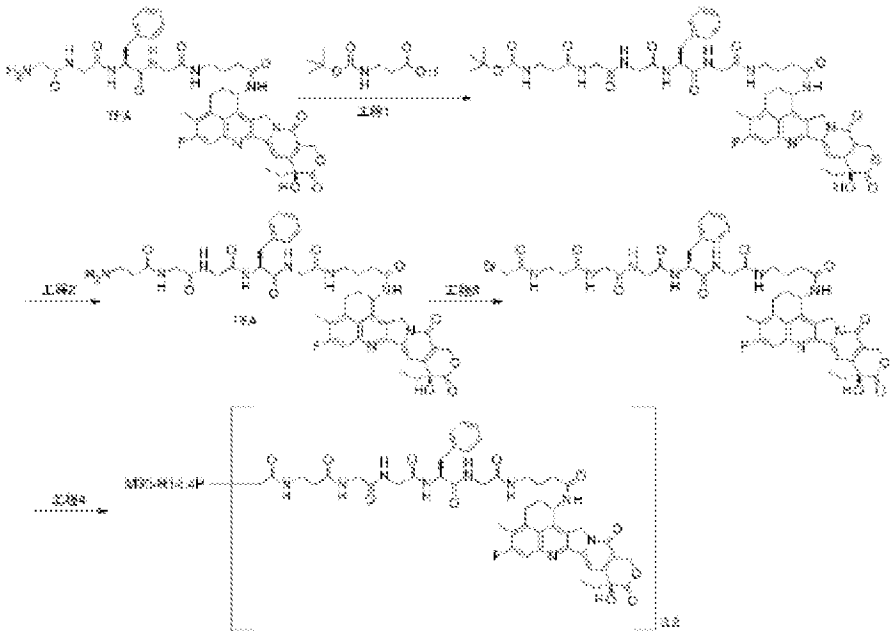
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１３．６０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．５ｍｇ（７６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．３

[0317] 実施例３０　抗体－薬物コンジュゲート（２９）

[0318]

[化99]



[0319] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－β－アラニルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ）－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２の工程２で得た化合物（０．８３９ｇ，１．００ｍｍｏＬ）を、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりにＮ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－β－アラニンを用いて実施例１の工程１と同様に反応させ、得られた粗生成物を精製せずに次の工程に用いた。

[0320] 工程２：β－アラニルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ）－４－オキソブチル）グリシンアミド

上記工程１で得た粗生成物を、実施例２の工程２と同様に反応させ、標記化合物（０．６１０ｇ，６７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．６７－１．７７（２Ｈ，ｍ），１．７９－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０９－２．２２（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．４６－２．５５（２Ｈ，ｍ），２．８２－２．７３（１Ｈ，ｍ），２．９５－３．１３（５Ｈ，ｍ），３．１４－３．２１（２Ｈ，ｍ），３．５５－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．４４－４．５２（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝３５．０，１９．０Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．１４－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６７（２Ｈ，ｂｒｓ），７．７２－７．７８（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．１０－８．１７（２Ｈ，ｍ），８．２９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．４２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

[0321] 工程３：Ｎ－（ブロモアセチル）－β－アラニルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

２－ブロモ酢酸（９６．３ｍｇ，０．６９３ｍｍｏＬ）のジクロロメタン（４．５ｍＬ）溶液へ、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（７９．７ｍｇ，０．６９３ｍｍｏＬ）、１，３－ジイソプロピルカルボジイミド（０．１０７ｍＬ，０．６９３ｍｍｏＬ）を加え室温で撹拌した。反応溶液を、上記工程２で得た化合物（４７３ｍｇ，０．４６２ｍｍｏＬ）、トリエチルアミン（０．１５４ｍＬ，１．１１ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４．５ｍＬ）溶液へ０℃で加え、室温で１時間撹拌した。反応溶液をシリカゲ

ルカラムクロマトグラフィー［溶出溶媒：クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８５：１５（ｖ／ｖ）］にて精製し、得られた固体をクロロホルム：メタノール：ジエチルエーテル混合溶媒にて洗浄することで、標記化合物（１９１ｍｇ，４０％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．６７－１．７７（２Ｈ，ｍ），１．７９－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２２（４Ｈ，ｍ），２．３３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７４－２．８３（１Ｈ，ｍ），２．９９－３．１２（３Ｈ，ｍ），３．１４－３．２１（２Ｈ，ｍ），３．２４－３．３０（２Ｈ，ｍ），３．５６－３．７７（６Ｈ，ｍ），３．８２（２Ｈ，ｓ），４．４１－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６９－７．７４（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２１－８．３４（３Ｈ，ｍ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０３０，１０３２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0322] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（２９）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２５ｍＬ；抗体一分子に対して３．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗

体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０９ｍＬ）と上記工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０５９ｍＬ；抗体一分子に対して７．０当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００９ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

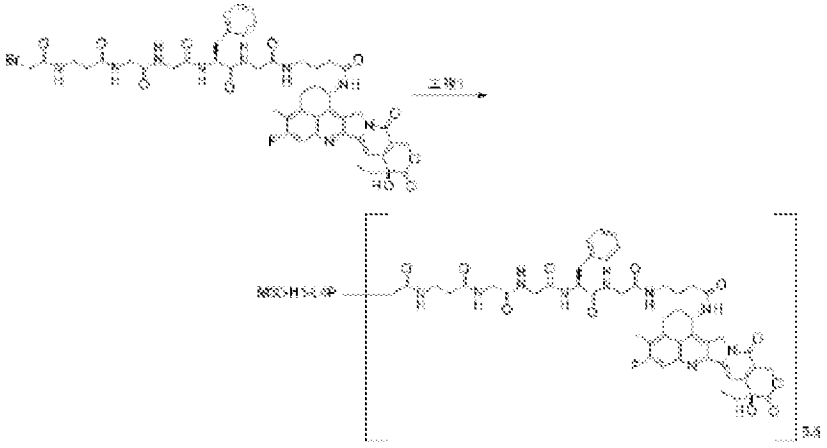
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して，下記の特性値を得た。

抗体濃度：１３．９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．７ｍｇ（７８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２

[0323] 実施例３１　抗体－薬物コンジュゲート（３０）

[0324] [化100]

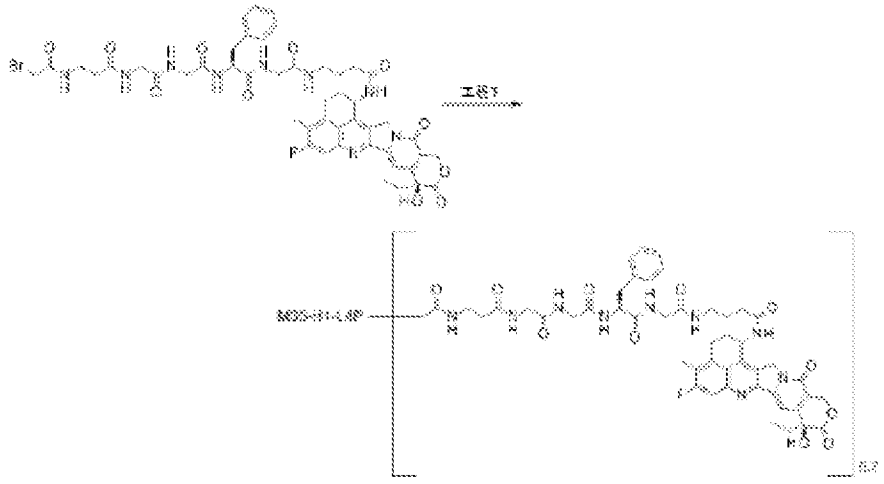


[0325] 参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例３０の工程３で得た化合物を用いて、実施例４の工程１と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．９４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．６４ｍｇ（９３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．６

[0326] 実施例３２　抗体－薬物コンジュゲート（３１）

[0327] [化101]



[0328] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３１）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例３０の工程３で得た化合物を用いて、実施例５の工程１と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

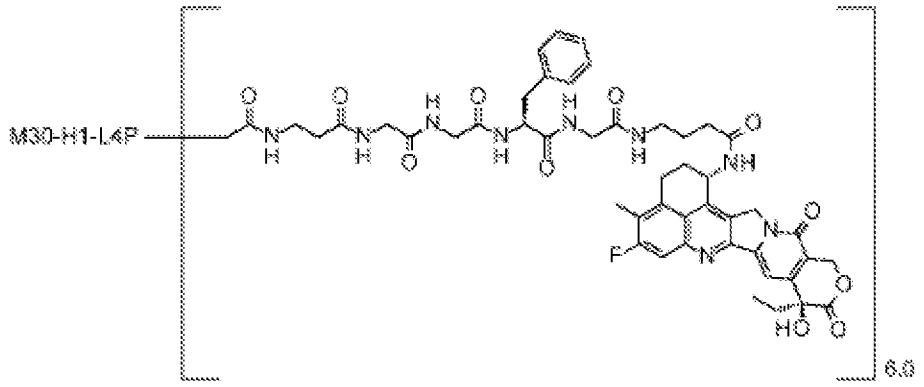
抗体濃度：１．９０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．４０ｍｇ（９１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．７

[0329] 実施例３３　抗体－薬物コンジュゲート（３２）

[0330]

OnCusp
Ex. 1002

[化102]



[0331] 実施例３１と実施例３２の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

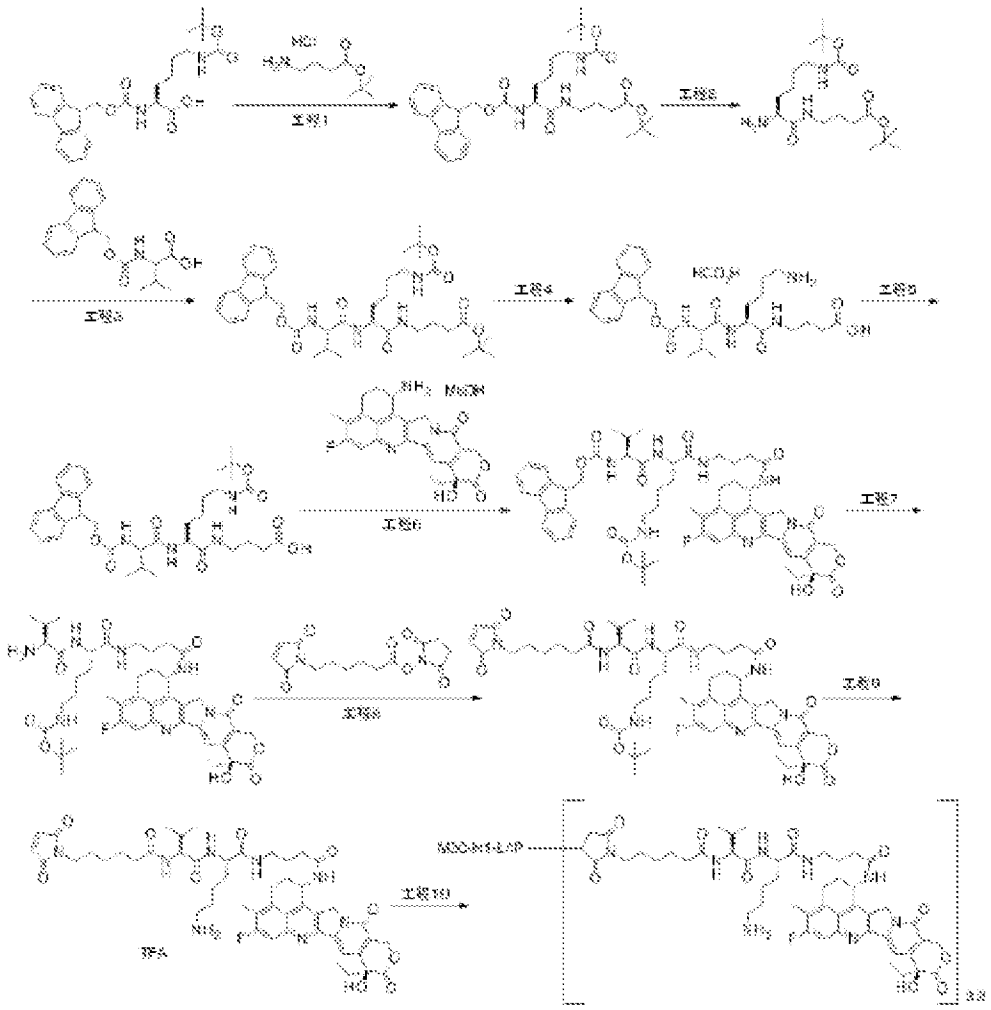
抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２１．０６ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．０

[0332] 実施例３４　抗体－薬物コンジュゲート（３３）

[0333]

OnCusp
Ex. 1002

[化103]



[0334] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　４－（｛Ｎ^{6}－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ^{2}－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジル｝アミノ）ブタノエート

Ｎ^{6}－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ^{α}－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン（１．００ｇ，２．１４ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．３７０ｇ，３．２０ｍｍｏＬ），及びｔｅｒｔ－ブチル４－アミノブタン酸エステル塩酸塩（０．８３０ｇ，４．２７ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．６１０ｇ，３．２０ｍｍｏＬ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチ

ルアミン（０．４１０ｍｌ，２．３５ｍｍｏｌ）を加え、室温にて３日間撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、１０％クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、標記化合物（１．３５ｇ，定量的）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：１．１４－１．４２（４Ｈ，ｍ），１．３６（９Ｈ，ｓ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．４８－１．６７（４Ｈ，ｍ），２．１８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．８４－２．９３（２Ｈ，ｍ），２．９９－３．１１（２Ｈ，ｍ），３．８４－３．９４（１Ｈ，ｍ），４．１８－４．３０（３Ｈ，ｍ），６．７６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），７．３３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．３９－７．４５（３Ｈ，ｍ），７．７３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝７．３，２．７Ｈｚ），７．８５－７．９２（３Ｈ，ｍ）．

[0335] 工程２：ｔｅｒｔ－ブチル　４－｛［Ｎ^6－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｌ－リジル］アミノ｝ブタノエート

上記工程１で得た化合物（１．３５ｇ，２．２２ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（８．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（２．００ｍＬ）を加え、室温で１．５時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。

[0336] 工程３：Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－バリル－Ｎ^6－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ－（４－ｔｅｒｔ－ブトキシ－４－オキソブチル）－Ｌ－リシンアミド

上記工程２で得た混合物（２．２２ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－バリン（１．１３ｇ，３．３２ｍｍｏＬ），Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．３１０ｇ，２．６６ｍｍｏＬ），及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．５５０ｇ，２．８８ｍｍｏＬ）を加え、室温にて１８時間撹拌した。反応液

を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、（０．３６３ｇ，２３％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８４（６Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），１．１２－１．６４（８Ｈ，ｍ），１．３４（９Ｈ，ｓ），１．３８（９Ｈ，ｓ），１．９０－２．０４（１Ｈ，ｍ），２．１７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），２．７９－２．９０（２Ｈ，ｍ），２．９９－３．０９（２Ｈ，ｍ），３．８３－３．９１（１Ｈ，ｍ），４．０８－４．４４（４Ｈ，ｍ），６．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），７．３２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．４２（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．７４（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），７．８５－７．９１（４Ｈ，ｍ），ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：７０９（Ｍ＋Ｈ）$^+$

［0337］工程４：Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－バリル－Ｎ－（３－カルボキシプロピル）－Ｌ－リシンアミドギ酸塩

上記工程３で得た化合物（０．３６３ｍｇ，０．５１２ｍｍｏＬ）にギ酸（１０．０ｍｌ）を加え、室温で４時間撹拌した。減圧下溶媒を留去し、標記化合物を得た。本化合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。

［0338］工程５：Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－バリル－Ｎ^6－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ－（３－カルボキシプロピル）－Ｌ－リシンアミド

上記工程４で得た化合物（０．５１２ｍｍｏＬ）の１，４－ジオキサン（５．００ｍＬ）懸濁液に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（２０．０ｍｌ）及びジ－ｔｅｒｔ－ブチルジカルボネート（０．１７８ｍｌ，０．７６９ｍｍｏＬ）を加え、室温にて３時間撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、１０％クエン酸水溶液及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシ

ウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、標記化合物（０．２９５ｇ，８８％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８４（６Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），１．１３－１．３９（４Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．４８－１．６２（４Ｈ，ｍ），１．９１－２．０４（１Ｈ，ｍ），２．２０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），２．８０－２．８９（２Ｈ，ｍ），２．９９－３．１１（２Ｈ，ｍ），３．８７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝８．５，６．７Ｈｚ），４．０６－４．３５（４Ｈ，ｍ），６．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），７．３２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），７．３９－７．４６（３Ｈ，ｍ），７．７４（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），７．８３－７．９４（４Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：６５３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0339] 工程６：Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－バリル－Ｎ^6－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）－Ｌ－リシンアミド

化合物（４）のメシル酸塩（０．２４０ｇ、０．４５２ｍｍｏＬ）を、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりに上記工程５で得た化合物（０．２９５ｇ，０．４５２ｍｍｏＬ）を用いて、実施例１の工程１と同様に反応させ、標記化合物（０．２０８ｇ，４３％）を淡橙色固体として得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０７１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0340] 工程７：Ｌ－バリル－Ｎ^6－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒド

ロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ）－４－オキソブチル）－Ｌ－リシンアミド

上記工程６で得た化合物（０．２０８ｇ，０．１９４ｍｍｏＬ）を、上記工程２と同様に反応させ、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。

[0341] 工程８：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］－Ｌ－バリル－Ｎ^{5}－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）－Ｌ－リシンアミド

上記工程７で得た混合物（０．１９４ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（０．１３３ｇ，５６％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．７７（６Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．１４－１．７１（１０Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．７７－１．９５（３Ｈ，ｍ），２．０２－２．２３（７Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．８４（３Ｈ，ｑ，Ｊ＝６．４Ｈｚ），３．０５（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｓ），３．２６－３．３９（３Ｈ，ｍ），４．０１－４．１６（２Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．３６－５．４８（２Ｈ，ｍ），５．５１－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），６．７２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７１－７．８５（５Ｈ，ｍ），８．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０４１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0342] 工程９：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］－Ｌ－バリル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）－Ｌ－リシンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程８で得た化合物（０．１１０ｍｇ，０．１０６ｍｍｏＬ）のジクロロメタン（１０．０ｍｌ）溶液に、トリフルオロ酢酸（４．００ｍｌ）を加え、室温で５時間撹拌した。減圧下溶媒を留去し、標記化合物（７０．０ｍｇ，６４％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．７６－０．８１（６Ｈ，ｍ），０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．１２－１．３１（４Ｈ，ｍ），１．３９－１．５６（８Ｈ，ｍ），１．５７－１．７４（３Ｈ，ｍ），１．７９－１．９６（３Ｈ，ｍ），２．０６－２．１８（７Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７０－２．８０（２Ｈ，ｍ），３．０１－３．１０（２Ｈ，ｍ），３．１３－３．２２（２Ｈ，ｍ），４．０４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），４．１０－４．２０（１Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．３６－５．４７（２Ｈ，ｍ），５．５２－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．６１（３Ｈ，ｂｒｓ），７．７５－７．８８（４Ｈ，ｍ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：９４１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0343] 工程１０：抗体－薬物コンジュゲート（３３）

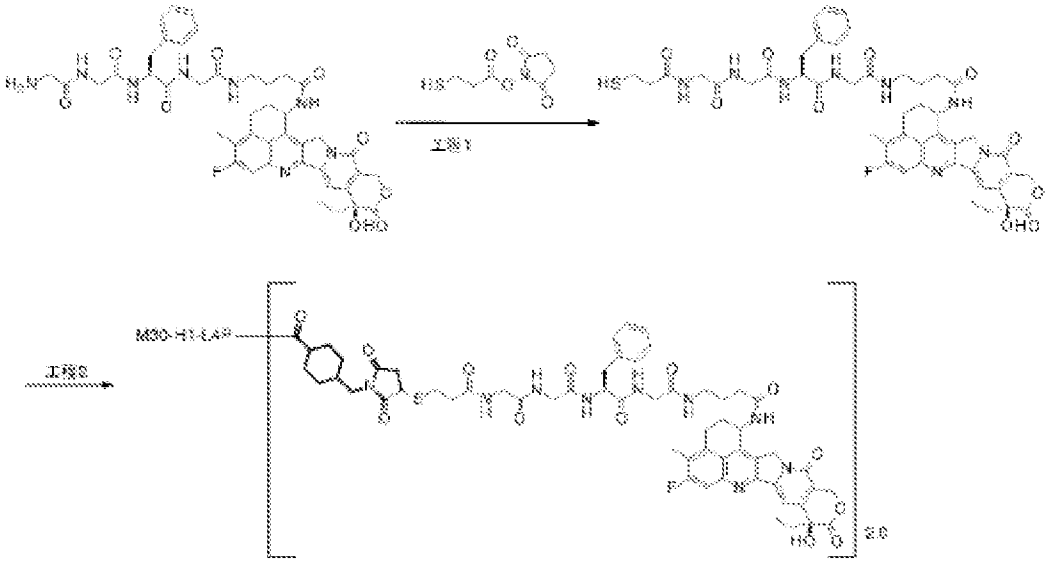
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程９で得た化合物を用いて、実施例２９の工程２と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

OnCusp
Ex. 1002

抗体濃度：１２．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．４ｍｇ（６７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２

[0344] 実施例３５　抗体－薬物コンジュゲート（３４）

[0345] [化104]



[0346] 工程１：Ｎ－（３－スルファニルプロパノイル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２の工程２で得た化合物（８４．０ｍｇ，０．１００ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－メルカプトプロピオン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（６１．２ｍｇ，６６％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－Ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７７－１．６６（２Ｈ，ｍ），１．７９－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．２４（４Ｈ，ｍ），２．３１－２．４７（３Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．５９－２．６９（２Ｈ，ｍ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ

，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），２．９８－３．１３（３Ｈ，ｍ），３．１４－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．５４－３．７９（６Ｈ，ｍ），４．４０－４．５０（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝３６．８，１９．２Ｈｚ），５．３６－５．４７（２Ｈ，ｍ），５．５２－５．６３（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．１４－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６８－７．７４（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０３－８．０９（１Ｈ，ｍ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１９－８．２９（２Ｈ，ｍ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：９２７（Ｍ＋Ｈ）＋

[0347] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（３４）

抗体のＳＭＣＣ誘導体化：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、２０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．２５ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに入れ、ここにｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ－４－（Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ）ｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ－１－ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ（ＳＭＣＣ，　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ．）を２７．６ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．００６３ｍＬ；抗体一分子に対して約２．５５当量相当）を室温下加え、室温で２時間反応させた。この反応液を共通操作Ｄ－２を用いた精製を行い、ＳＭＣＣ誘導体化された抗体を約５ｍｇ含む溶液を０．７ｍＬ得た。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ＤＭＳＯ（０．０４５ｍＬ）と上記工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０１５ｍＬ；抗体一分子に対して約２．４当量相当）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，　アズワン株式会社）を用いて室温下１６時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。

精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた

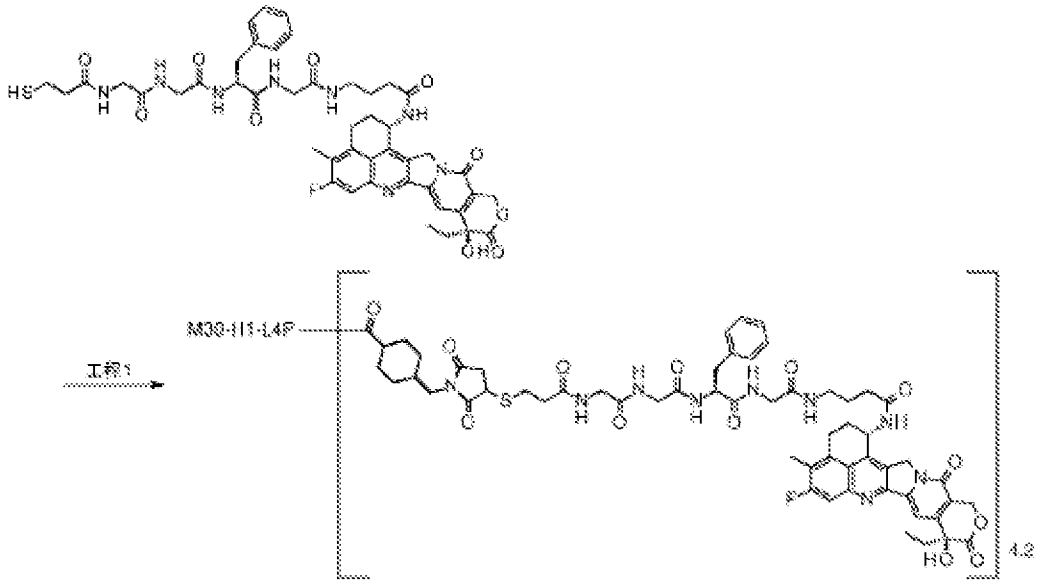
精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を３．５ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：３．８５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：０．８ｍｇ（１６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．９

[0348] 実施例３６　抗体－薬物コンジュゲート（３５）

[0349] [化105]



[0350] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３５）

抗体のＳＭＣＣ誘導体化：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、２０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．２５ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに入れ、ここにｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ－４－（Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ）ｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ－１－ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ（ＳＭＣＣ，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ

OnCusp
Ex. 1002

、）を２７．６ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０１２５ｍＬ；抗体一分子に対して約５．１当量相当）を室温下加え、室温で２時間反応させた。この反応液を共通操作Ｄ－２を用いた精製を行い、ＳＭＣＣ誘導体化された抗体を約５ｍｇ含む溶液を０．７ｍＬ得た。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ＤＭＳＯ（０．０３ｍＬ）と実施例３５の工程１で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０３ｍＬ；抗体一分子に対して約４．８当量相当）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１６時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。

精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を３．５ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

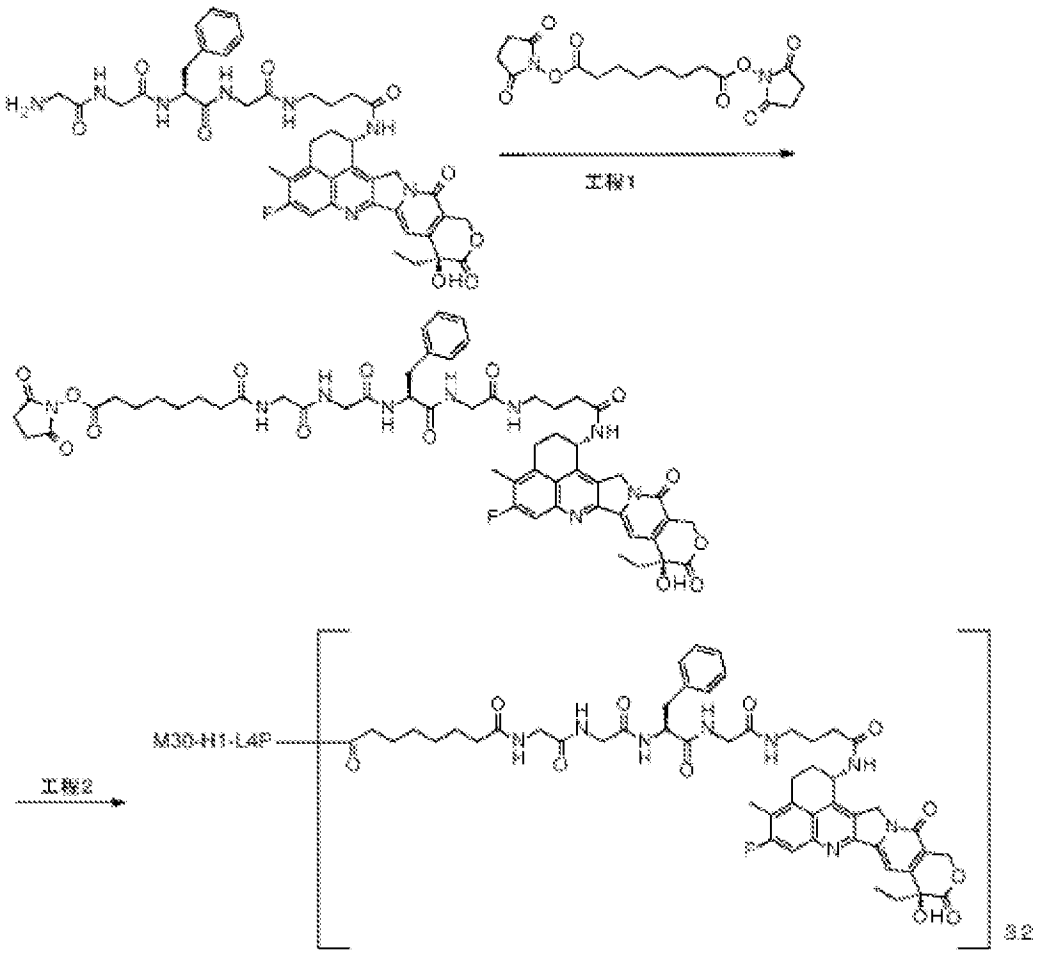
特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．４３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：０．５ｍｇ（１０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．２

[0351] 実施例３７　抗体－薬物コンジュゲート（３６）

[0352]

[化106]



[0353] 工程１：Ｎ－｛８－［（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ］－８－オキソオクタノイル｝グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２の工程２で得た化合物（８４．０ｍｇ，０．１００ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりにスベリン酸ジ（Ｎ－スクシンイミジル）を用いて実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（７７．１ｍｇ，７１％）を淡黄色固体として得た。

^{1}H－NMR（DMSO－D_6）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．２１－１．３８（４Ｈ，ｍ），１．４３－１．５０（２Ｈ，ｍ），１．５５－１．６３（２Ｈ，ｍ），１．６８－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．２２（６Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．６０－２．６７（２Ｈ，ｍ），２．７６－２．８４（５Ｈ，ｍ），２．９７－３．２２（５Ｈ，ｍ），３．５６－３．７６（６Ｈ，ｍ），４．４０－４．５０（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３７－５．４８（２Ｈ，ｍ），５．５３－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０９２（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0354] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（３６）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、２０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．２５ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに入れ、ここに、上記工程１にて得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液０．０２５ｍＬ（抗体一分子に対して約３．７当量相当）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１６時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を３．５ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

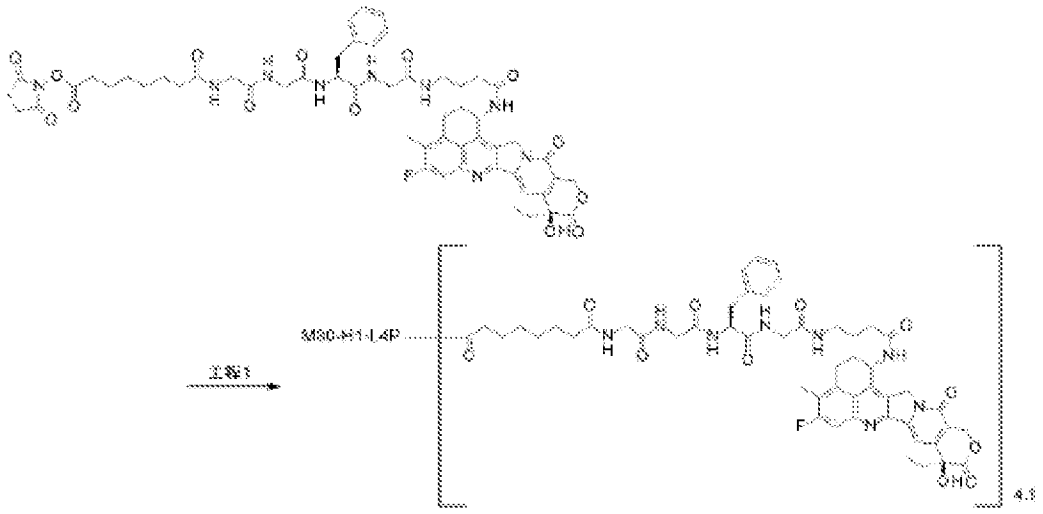
特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算

推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：６．２５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１．３ｍｇ（２６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２

[0355] 実施例３８　抗体－薬物コンジュゲート（３７）

[0356] [化107]



[0357] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３７）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、２０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．５ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに入れたのち、ここに、ＤＭＳＯ（０．０２５ｍＬ）と実施例３７の工程１にて得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０２５ｍＬ；抗体一分子に対して約７．４当量相当）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１６時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。

精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を３．５ｍＬ得

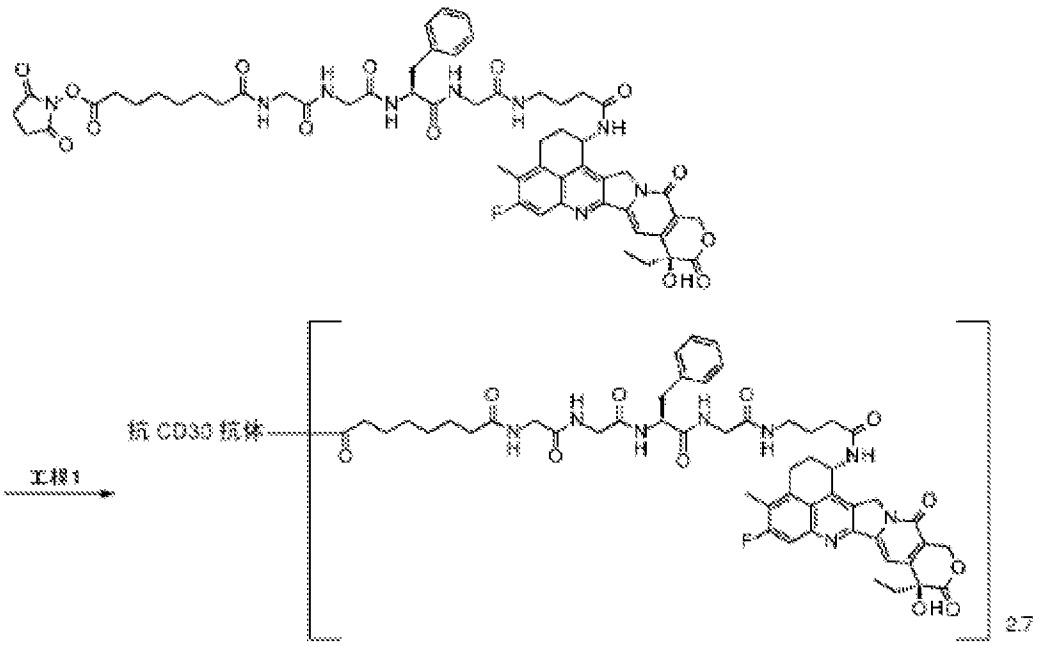
たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：４．３６ｍｇ／ｍＬ，　抗体収量：０．９ｍｇ（１８％），　抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．１

[0358] 実施例３９　抗体ー薬物コンジュゲート（３８）

[0359] [化108]



[0360] 工程１：抗体ー薬物コンジュゲート（３８）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れたのち、ここに、ＤＭＳＯ（０．０１７ｍＬ）と実施例３７の工程１にて得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０２３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量相当）を室温下加え、チューブ・ロー

データー（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。

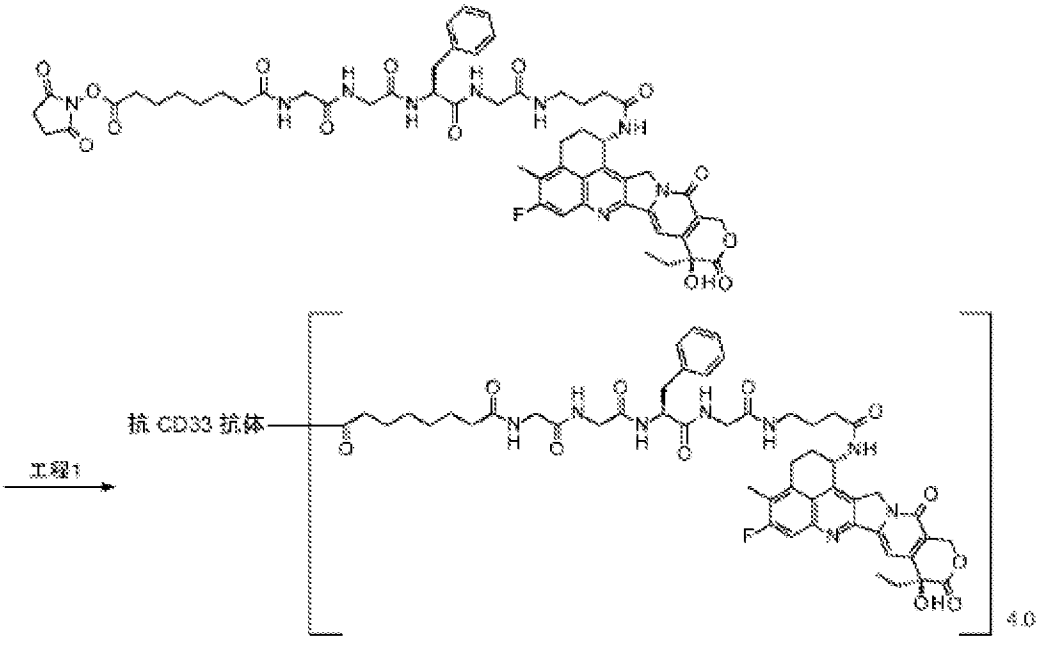
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝２６７０（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１５８２０（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．５５ｍｇ／ｍＬ，　抗体収量：１．４ｍｇ（３４％），　抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．７

[0361] 実施例４０　抗体－薬物コンジュゲート（３９）

[0362] [化109]



[0363] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３９）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）

を１．５ｍＬチューブに入れたのち、ここに、ＤＭＳＯ（０．０１７ｍＬ）と実施例３７の工程１にて得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０２３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量相当）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。

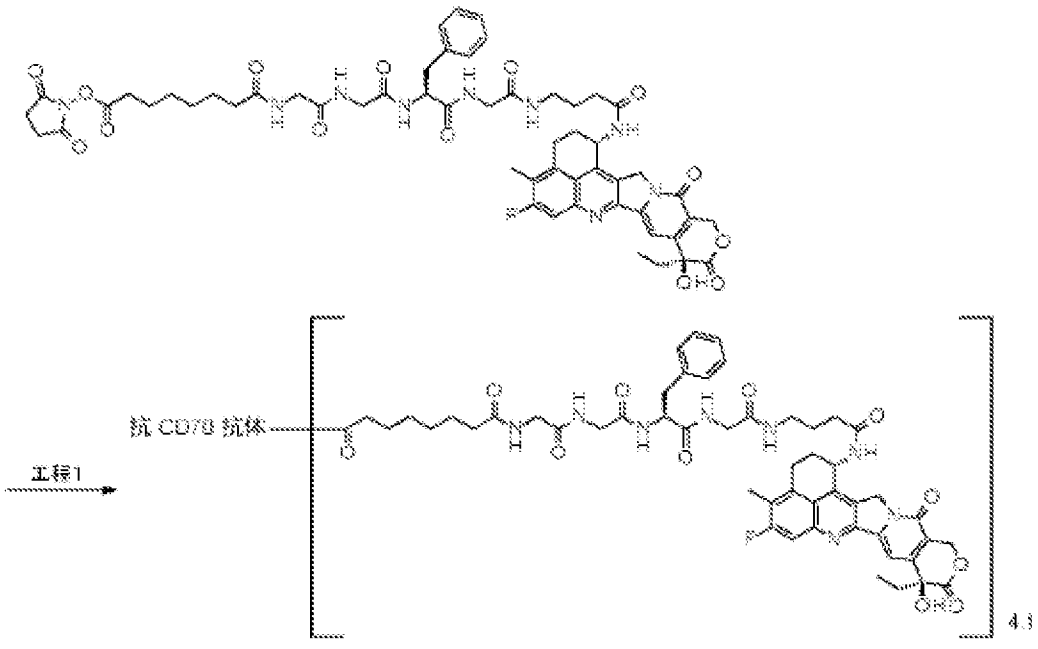
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値），$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値），$\varepsilon_{D,280}$＝２６７０（実測値），$\varepsilon_{D,370}$＝１５８２０（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９３ｍｇ／ｍＬ，　抗体収量：２．３ｍｇ（５８％），　抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．０

〔0364〕実施例４１　抗体－薬物コンジュゲート（４０）

〔0365〕〔化110〕



〔0366〕工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４０）

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例５にて作製した抗ＣＤ７

０抗体を、共通操作Ｃ－２及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９ｍＬ ｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れたのち、ここに、ＤＭＳＯ（０．０１７ｍＬ）と実施例３７の工程１にて得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０２３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量相当）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。

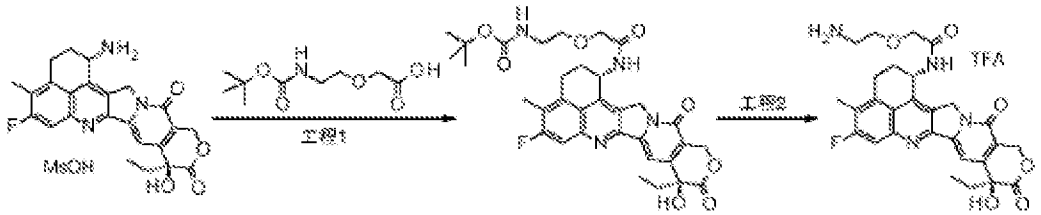
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝２６７０（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１５８２０（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．０４ｍｇ／ｍＬ，　抗体収量：２．６ｍｇ（６５％），　抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．１

[0367] 実施例４２　２－（２－アミノエトキシ）－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アセトアミド

[0368] [化111]



[0369] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，

3，9，10，13，15－ヘキサヒドロ－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－1－イル］アミノ｝－2－オキソエトキシ）エチル］カーバメート

化合物（4）のメシル酸塩（3，10g、5，47mol）を、4－（tert－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりに｛2－［（tert－ブトキシカルボニル）アミノ］エトキシ｝酢酸（J．Med．Chem．，1992年，35巻，2928項）（1，55g，6，01mmol）を用いて、実施例1の工程1と同様に反応させ、標記化合物（2．56g，73%）を淡黄色固体として得た。

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．87（3H，t，J＝7．3Hz），1．26（9H，s），1．81－1．91（2H，m），2．13－2．22（2H，m），2．40（3H，s），3．08－3．26（4H，m），3．43－3．53（2H，m），4．00（1H，d，J＝15．1Hz），4．05（1H，d，J＝15．1Hz），5．14（1H，d，J＝18．7Hz），5．22（1H，d，J＝18．7Hz），5．40（1H，d，J＝16．6Hz），5．44（1H，d，J＝16．6Hz），5．59－5．66（1H，m），6．53（1H，s），6．86（1H，t，J＝5．4Hz），7．31（1H，s），7．79（1H，d，J＝10．9Hz），8．49（1H，d，J＝9．1Hz）．

MS（APCI）m／z：637（M+H）$^+$

[0370] 工程2：2－（2－アミノエトキシ）－N－［（1S，9S）－9－エチル－5－フルオロ－9－ヒドロキシ－4－メチル－10，13－ジオキソ－2，3，9，10，13，15－ヘキサヒドロ－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－1－イル］アセトアミド

上記工程1で得た化合物（1，50g，2，36mol）を、実施例1の工程2と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（1．50g，

OnCusp
Ex. 1002

定量的）を淡黄色固体として得た。抗体－薬物コンジュゲート（４１）を担癌マウスに投与した際に、この化合物が腫瘍中で確認された。

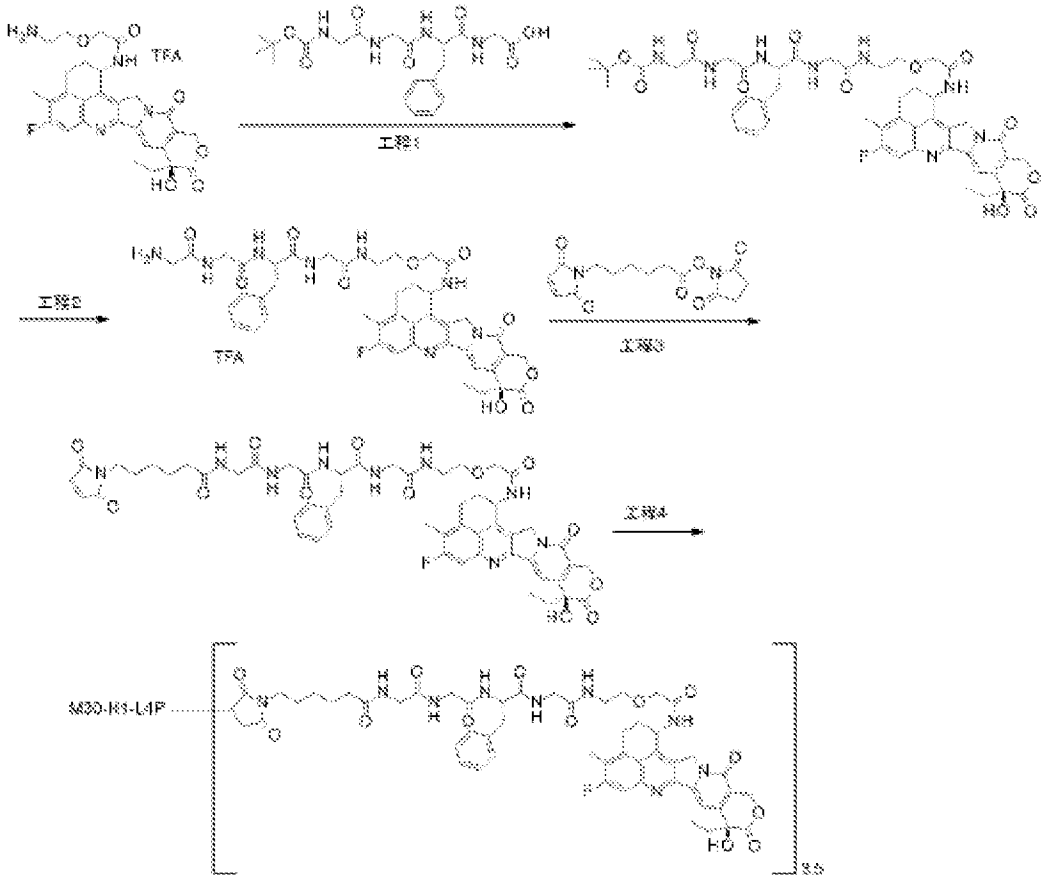
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．８１－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．１５－２．２３（２Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），３．０５（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），３．１５－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．７１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），４．１０（２Ｈ，ｓ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５８－５．６６（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．７３－７．８４（４Ｈ，ｍ），８．５５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５３７（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0371] 実施例４３　抗体－薬物コンジュゲート（４１）

[0372]

[化112]



[0373] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）エチル］グリシンアミド

実施例４２の化合物（５５４ｍｇ，０．８５ｍｍｏｌ）を、実施例２の工程１と同様に反応させ、標記化合物（７７５ｍｇ，９５％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８５（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．３６（９Ｈ，ｓ），１．７８－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１３－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．４，９．８Ｈｚ），２．９５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３

、4，4．3Ｈｚ），3．09－3．23（1Ｈ，ｍ），3．23－3．32（2Ｈ，ｍ），3．40－3．62（8Ｈ，ｍ），3．73（1Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝16．5，5．5Ｈｚ），4．03（2Ｈ，ｓ），4．39－4．47（1Ｈ，ｍ），5．17（1Ｈ，ｄ，Ｊ＝18．9Ｈｚ），5．25（1Ｈ，ｄ，Ｊ＝18．9Ｈｚ），5．41（1Ｈ，ｄ，Ｊ＝16．8Ｈｚ），5．45（1Ｈ，ｄ，Ｊ＝16．8Ｈｚ），5．57－5．64（1Ｈ，ｍ），6．54（1Ｈ，ｓ），6．99（1Ｈ，ｔ，Ｊ＝5．8Ｈｚ），7．13－7．26（5Ｈ，ｍ），7．31（1Ｈ，ｓ），7．76－7．82（2Ｈ，ｍ），7．90（1Ｈ，ｔ，Ｊ＝5．2Ｈｚ），8．13（1Ｈ，ｄ，Ｊ＝7．9Ｈｚ），8．27（1Ｈ，ｔ，Ｊ＝5．8Ｈｚ），8．49（1Ｈ，ｄ，Ｊ＝8．5Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：955（Ｍ＋Ｈ）＋

[0374] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）エチル］グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程１で得た化合物（６３０ｍｇ，０．６５９ｍｍｏｌ）を、実施例２の工程２と同様に反応させ、標記化合物（５８８ｍｇ，９２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７９－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．１３－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．４，１０．１Ｈｚ），２．９９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．４，４．３Ｈｚ），３．０９－３．２３（１Ｈ，ｍ），３．２４－３．３２（３Ｈ，ｍ），３．４１－３．７１（７Ｈ，ｍ），３．８６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．８，５．８Ｈｚ），４．０４（２Ｈ，ｓ），４．５２（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝９．０，４．１Ｈｚ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，

d，J＝18．9Hz），5．41（1H，d，J＝16．5Hz），5．45（1H，d，J＝16．5Hz），5．56－5．65（1H，m），6．55（1H，s），7．13－7．26（5H，m），7．32（1H，s），7．80（1H，d，J＝11．0Hz），7．87－8．01（4H，m），8．29－8．36（2H，m），8．46－8．55（2H，m）．

MS（APCI）m／z：855（M+H）+

[0375] 工程3：N－［6－（2，5－ジオキソ－2，5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－L－フェニルアラニル－N－［2－（2－｛［（1S，9S）－9－エチル－5－フルオロ－9－ヒドロキシ－4－メチル－10，13－ジオキソ－2，3，9，10，13，15－ヘキサヒドロ－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3'，4'：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－1－イル］アミノ）－2－オキソエトキシ）エチル］グリシンアミド

上記工程2で得た化合物（240mg，0．247mmol）を、実施例2の工程3と同様に反応させ、標記化合物（162mg，62%）を得た。

^{1}H－NMR（400MHz，DMSO－d_6）δ：0．86（3H，t，J＝7．6Hz），1．13－1．22（2H，m），1．40－1．51（4H，m），1．78－1．90（2H，m），2．09（2H，t，J＝7．6Hz），2．14－2．21（2H，m），2．39（3H，s），2．74（1H，dd，J＝13．6，9．7Hz），2．96（1H，dd，J＝13．6，4．5Hz），3．08－3．24（1H，m），3．24－3．30（1H，m），3．33－3．40（4H，m），3．47－3．68（7H，m），3．72（1H，dd，J＝16．6，5．7Hz），4．03（2H，s），4．42（1H，td，J＝8．6，4．2Hz），5．17（1H，d，J＝18．7Hz），5．25（1H，d，J＝18．7Hz），5．40（1H，d，J＝17．2Hz），5．44（1H，d，J＝17．2Hz），5．57－5．64（1H，m），6．

OnCusp
Ex. 1002

５２（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２５（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８１（２Ｈ，ｍ），７．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０３－８．１１（２Ｈ，ｍ），８．２２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ），ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０４８（Ｍ＋Ｈ）＋

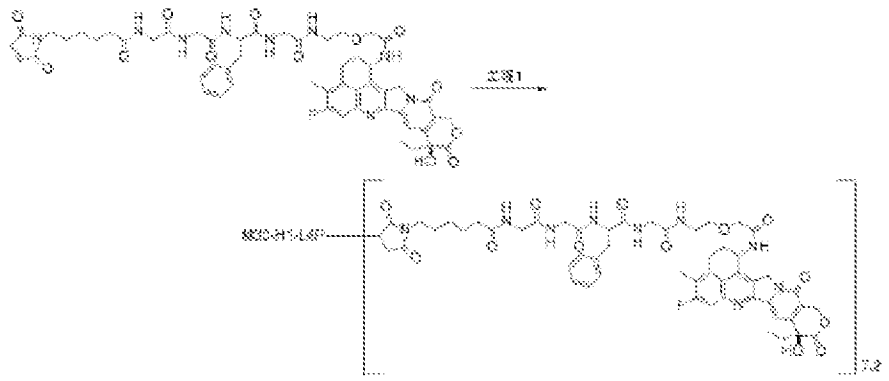
[0376] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（４１）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程３で得た化合物を用いて、実施例２９の工程２と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１２．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．４ｍｇ（６７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．５

[0377] 実施例４４　抗体－薬物コンジュゲート（４２）

[0378] [化113]



[0379] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４２）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例４３の工程３で得た化合物を用いて、実施例５の工程１と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

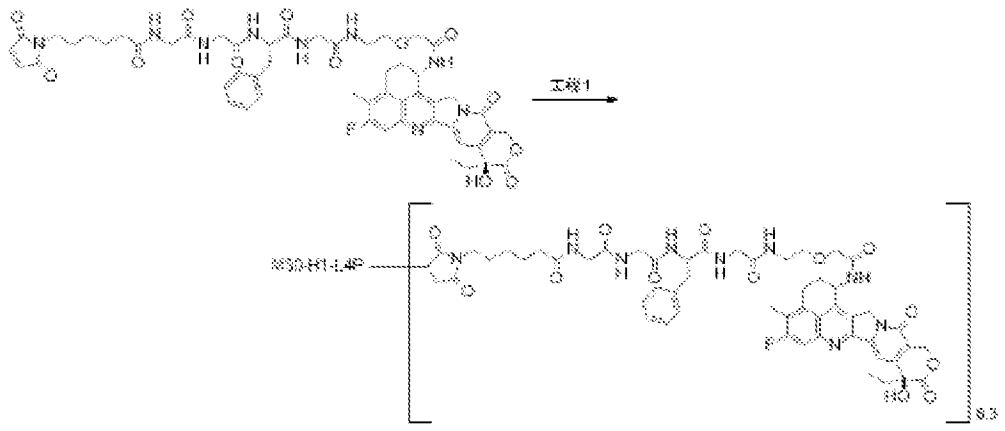
抗体濃度：０．８３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４．９８ｍｇ（４０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．２

[0380] 実施例４５　抗体－薬物コンジュゲート（４３）

[0381]

OnCusp
Ex. 1002

[化114]



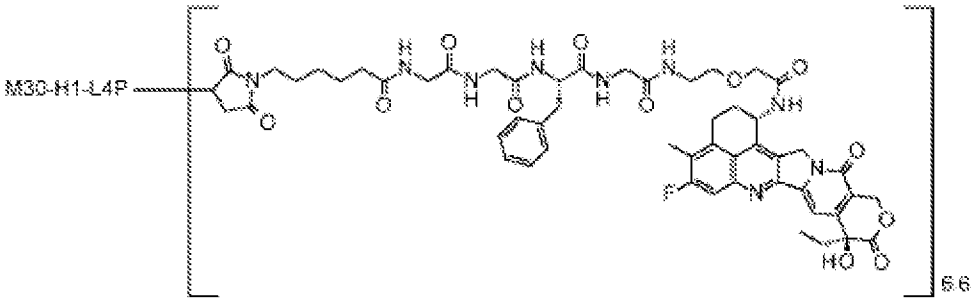
[0382] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４３）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例４３の工程３で得た化合物を用いて、実施例４の工程１と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．０６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．３６ｍｇ（５１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．３

[0383] 実施例４６　抗体－薬物コンジュゲート（４４）

[0384] [化115]



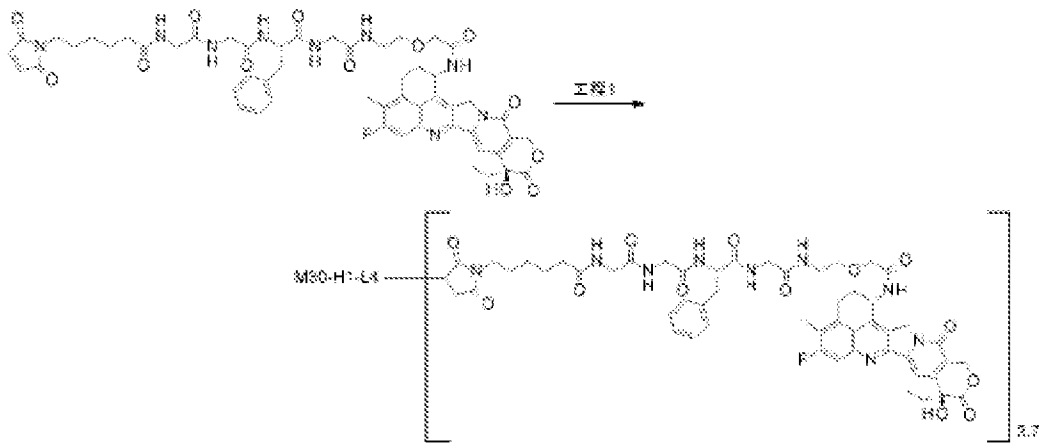
[0385] 実施例４４と実施例４５の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．２１ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．６

[0386] 実施例４７　抗体－薬物コンジュゲート（４５）

OnCusp
Ex. 1002

[0387] [化116]



[0388] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４５）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．２５ｍＬ、抗体１２．５ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２８７ｍＬ；抗体一分子に対して３、４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例４３の工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０４３９ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）及びジメチルスルホキシド（０．０２６７ｍＬ）を室温下加え、１５℃の水浴中で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００６６ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

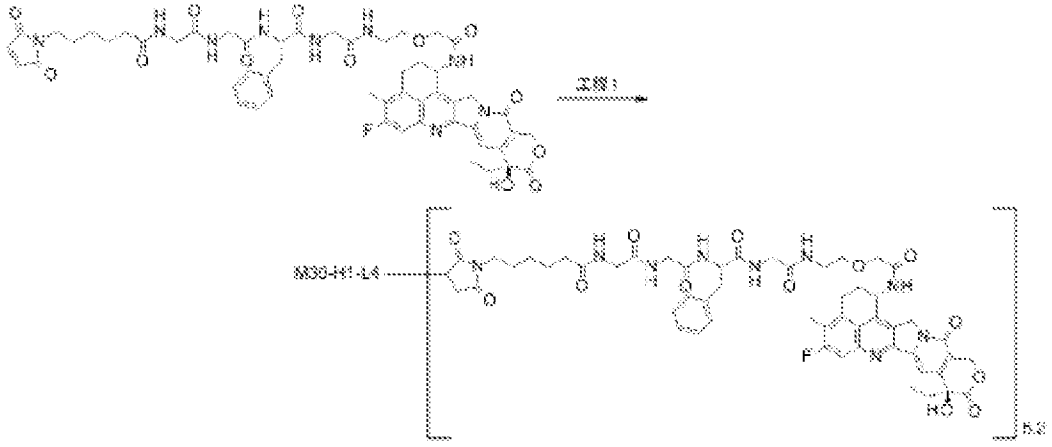
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１９３（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０３４７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．３ｍｇ（７４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．７

[0389] 実施例４８　抗体－薬物コンジュゲート（４６）

[0390] [化117]



[0391] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４６）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．２５ｍＬ、抗体１２．５ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０４３９ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）（０．０２８７ｍＬ；抗体一分子に対して３．４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液の

OnCusp
Ex. 1002

ｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例４３の工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０７２６ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）を室温下加え、１５℃の水浴中で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１９３（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０３４７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

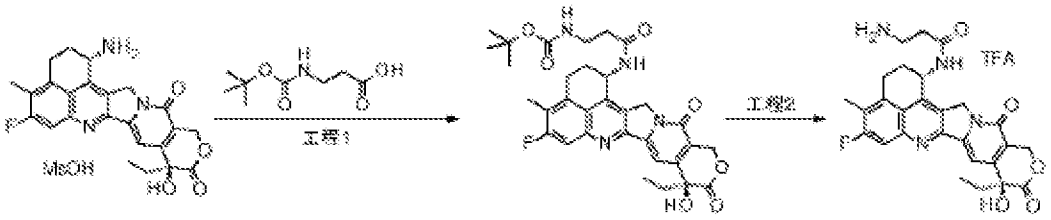
抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．８ｍｇ（６２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．２

[0392] 実施例４９　Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

[0393]

OnCusp
Ex. 1002

[化118]



[0394] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（３－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－３－オキソプロピル）カーバメート

化合物（４）のメシル酸塩（５００ｍｇ、０．９４１ｍｍｏＬ）を、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりにＮ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－β－アラニンを用いて、実施例１の工程１と同様に反応させ、標記化合物（６１６ｍｇ、定量的）を黄茶色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．２９（９Ｈ，ｓ），１．８６（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１５．１，７．３Ｈｚ），２．０４－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），３．１０－３．２６（４Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１８．８，１６．４Ｈｚ），５．５７（１Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝８．５，４．２Ｈｚ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．７８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：６０７（Ｍ＋Ｈ）＋

[0395] 工程２：Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－

ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

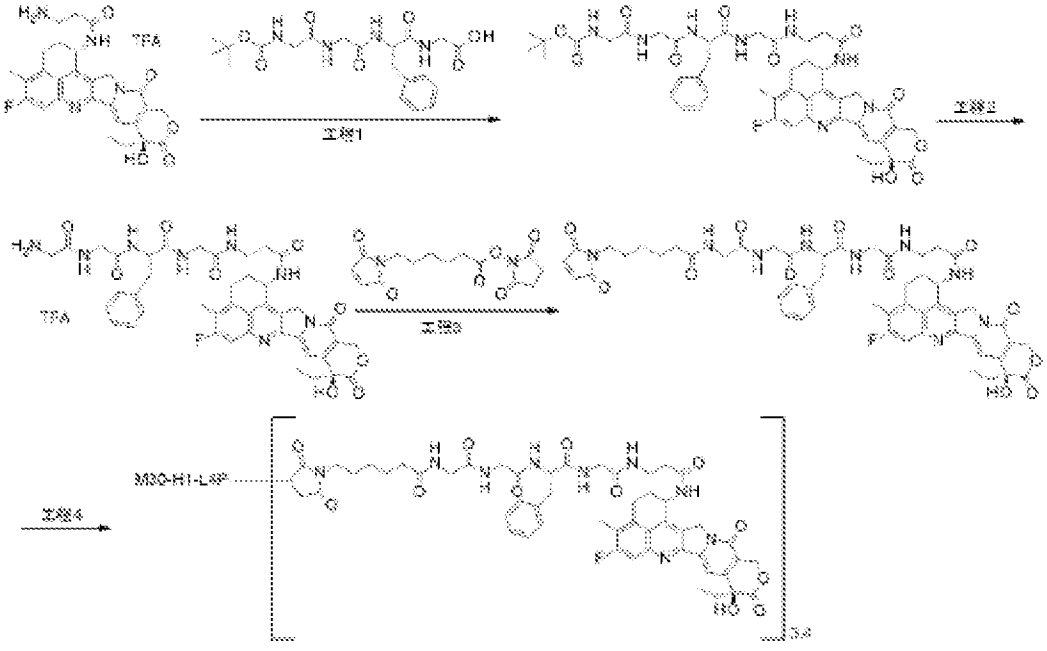
上記工程１で得た化合物を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（４９９ｍｇ、８６％）のトリフルオロ酢酸塩を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．８６（２Ｈ，ｄｑｕｉｎ，Ｊ＝１４．６，７．２，７．２，７．２，７．２Ｈｚ），２．０６－２．２７（１Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），２．４６－２．５７（２Ｈ，ｍ），３．０８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ），３．１４－３．２４（２Ｈ，ｍ），５．２２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５８（１Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝８．５，４．５Ｈｚ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７４（３Ｈ，ｂｒｓ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．６７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５０７（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0396] 実施例５０　抗体－薬物コンジュゲート（４７）

[0397] [化119]



OnCusp
Ex. 1002

[0398] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

実施例４９の化合物（４８４ｍｇ、０．７８０ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程１と同様に反応させ、標記化合物（６２６ｍｇ、８７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．２７－１．４２（９Ｈ，ｍ），１．７７－１．９３（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｄ，Ｊ＝１．６Ｈｚ），２．４４－２．５４（２Ｈ，ｍ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．５，１０．２Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１２－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．５２（６Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），４．４２－４．５４（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１８、４，１６．４Ｈｚ），５．５７（１Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝８．７，４．４Ｈｚ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．１４－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７７－７．８４（１Ｈ，ｍ），７．９１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），８．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ）．

[0399] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，

２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程１で得た化合物（６２４ｍｇ、０．６７５ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程２と同様に反応させ、標記化合物（６２６ｍｇ、９２％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８６（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．５，７．２Ｈｚ），２．０７－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．４４－２．５４（２Ｈ，ｍ），２．７５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．３Ｈｚ），３．１２－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．５８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝４．７Ｈｚ），３．６９（３Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１１．２，５．７Ｈｚ），３．８７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１７．０，５．７Ｈｚ），４．５４（１Ｈ，ｍ，Ｊ＝１７．８，４．５Ｈｚ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５１－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１４－７．２９（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．８８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），７．９７（３Ｈ，ｂｒｓ），８．２９－８．３８（２Ｈ，ｍ），８．５０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．５５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：８２５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

〔０４００〕工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

上記工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ、０．０６４６ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（１４．０ｍｇ，２１％）を

固体として得た。

^{1}H－NMR（４００MHz，DMSO－d_6）δ：０．８６（３H，t，J＝７．２Hz），１．１２－１．２２（２H，m），１．３９－１．５１（４H，m），１．７９－１．９１（２H，m），２．０２－２．２０（２H，m），２．０７（２H，t，J＝７．４Hz），２．３０－２．４２（４H，m），２．４０（３H，s），２．７８（１H，dd，J＝１４．１，９．４Hz），３．０２（１H，dd，J＝１４．７，４．９Hz），３．１２－３．２１（２H，m），３．２６－３．４２（２H，m），３．５０－３．８０（６H，m），４．４０－４．５１（１H，m），５．１９（１H，d，J＝１９．６Hz），５．２６（１H，d，J＝１９．２Hz），５．４２（２H，brs），５．５１－５．６２（１H，m），６．５３（１H，s），６．９９（２H，s），７．１３－７．２８（５H，m），７．３１（１H，s），７．７４－７．８４（２H，m），８．０１（１H，t，J＝５．３Hz），８．０６（１H，t，J＝５．７Hz），８．１４（１H，d，J＝８．２Hz），８．２５（１H，t，J＝５．７Hz），８．５３（１H，d，J＝８．６Hz）．

ＭＳ（ＥＳＩ）m／z：１０１８（M＋H）＋

[0401] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（４７）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程３で得た化合物を用いて、実施例２の工程４と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

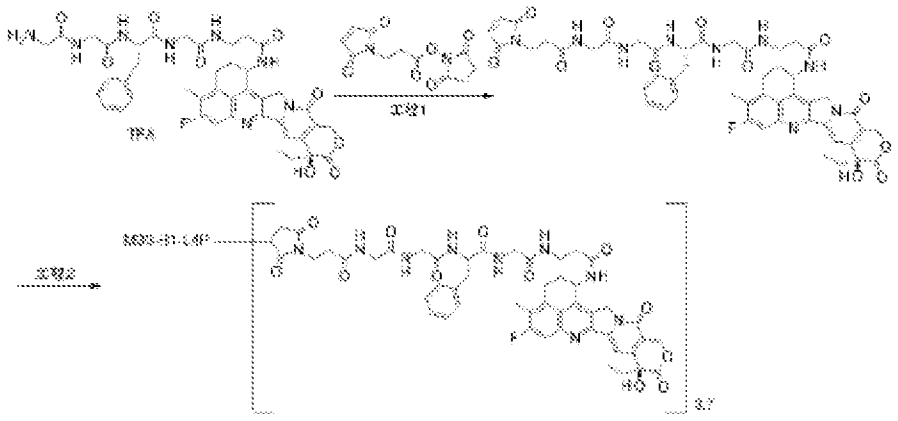
抗体濃度：１２．２７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．６ｍｇ（６９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0402] 実施例５１　抗体－薬物コンジュゲート（４８）

[0403]

OnCusp
Ex. 1002

[化120]



[0404] 工程１：Ｎ－［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

実施例５０の工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ、０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－マレイミドプロピオン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（３６．０ｍｇ、５７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８５（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１４．４，７．５Ｈｚ），２．０５－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．３０－２．４４（５Ｈ，ｍ），２．７３－２．８４（１Ｈ，ｍ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１７（３Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），３．２６－３．４０（２Ｈ，ｍ），３．４１－３．８１（６Ｈ，ｍ），４．４０－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５２－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，

OnCusp
Ex. 1002

s），7．13－7．28（5H，m），7．31（1H，s），7．80（2H，d，J＝10．2Hz），8．03（1H，t，J＝5．5Hz），8．12（1H，d，J＝8．2Hz），8．20－8．31（2H，m），8．52（1H，d，J＝8．6Hz）．

MS（ESI）m／z：976（M＋H）＋

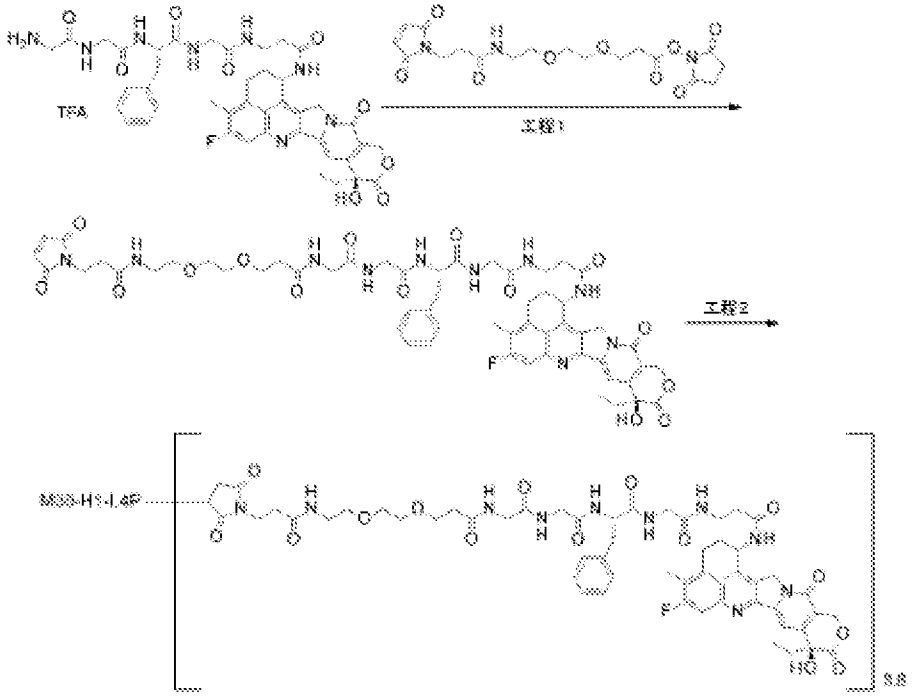
[0405] 工程2：抗体－薬物コンジュゲート（48）

参考例2にて作製したM30－H1－L4P抗体及び上記工程1で得た化合物を用いて、実施例2の工程4と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：11．59mg／mL，抗体収量：8．1mg（65%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：3．7

[0406] 実施例52　抗体－薬物コンジュゲート（49）

[0407] [化121]



[0408] 工程1：N－{3－[2－(2－{[3－(2，5－ジオキソ－2，5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル)プロパノイル]アミノ})エトキシ]プロパノイル}グリシルグリシル－L－フェニルアラニルグリシル－N－[

OnCusp
Ex. 1002

（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

実施例５０の工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－（２－（２－（３－マレインイミドプロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（２３．０ｍｇ，３１％）を固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７７－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．２１（２Ｈ，ｍ），２．２７－２．４２（６Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７４－２．８４（１Ｈ，ｍ），２．９７－３．０６（１Ｈ，ｍ），３．０９－３．２１（４Ｈ，ｍ），３．２５－３．３９（６Ｈ，ｍ），３．４５（４Ｈ，ｓ），３．５０－３．８０（８Ｈ，ｍ），４．４１－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｍ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５１－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８７（２Ｈ，ｍ），７．９３－８．０７（２Ｈ，ｍ），８．０９－８．２１（２Ｈ，ｍ），８．２６（１Ｈ，ｂｒｓ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１３５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0409] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（４９）

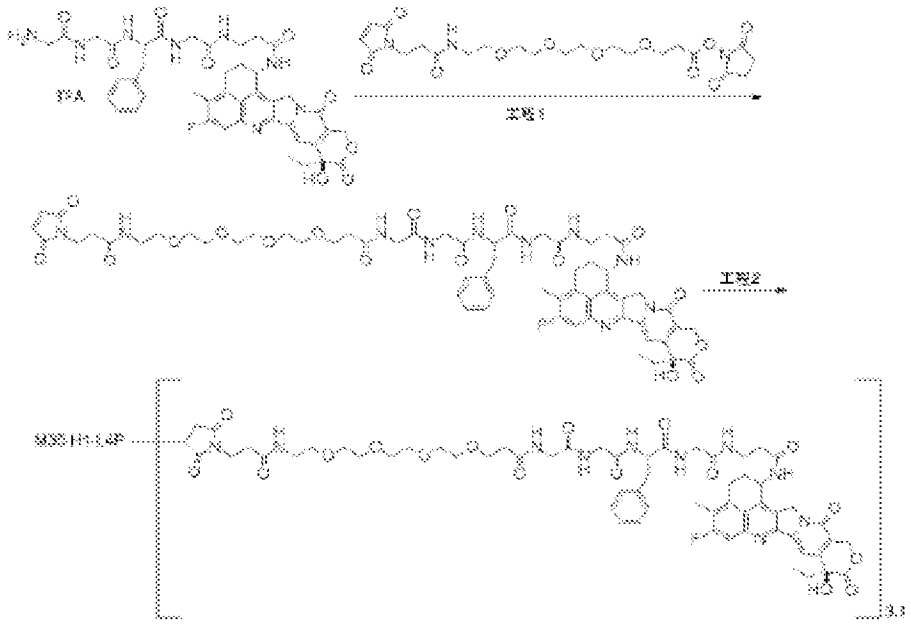
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例２９の工程２と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１４．５０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．２ｍｇ（８２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．８

OnCusp
Ex. 1002

[0410] 実施例５３　抗体－薬物コンジュゲート（５０）

[0411] [化122]



[0412] 工程１：Ｎ－［１９－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１７－オキソ－４，７，１０，１３－テトラオキサ－１６－アザノナンデカン－１－オイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

実施例５０の工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ、０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに１－マレインイミド－３－オキソ－７，１０，１３，１６－テトラオキサ－４－アザノナデカン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２の工程３と同様に反応させ、標記化合物（２３．０ｍｇ、２９％）を固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_6$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），１．８５（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．６，７．１Ｈｚ），２

OnCusp
Ex. 1002

．０６－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．２８－２．４３（６Ｈ，ｍ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．４Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，３．９Ｈｚ），３．０９－３．２２（４Ｈ，ｍ），３．２７－３．４１（４Ｈ，ｍ），３．４７（１２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），３．５３－３．８１（１０Ｈ，ｍ），４．４１－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．２９（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８５（２Ｈ，ｍ），８．０３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），８．１１－８．２１（２Ｈ，ｍ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１２２４（Ｍ＋Ｈ）＋

[0413] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（５０）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例２の工程４と同様の方法によって、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

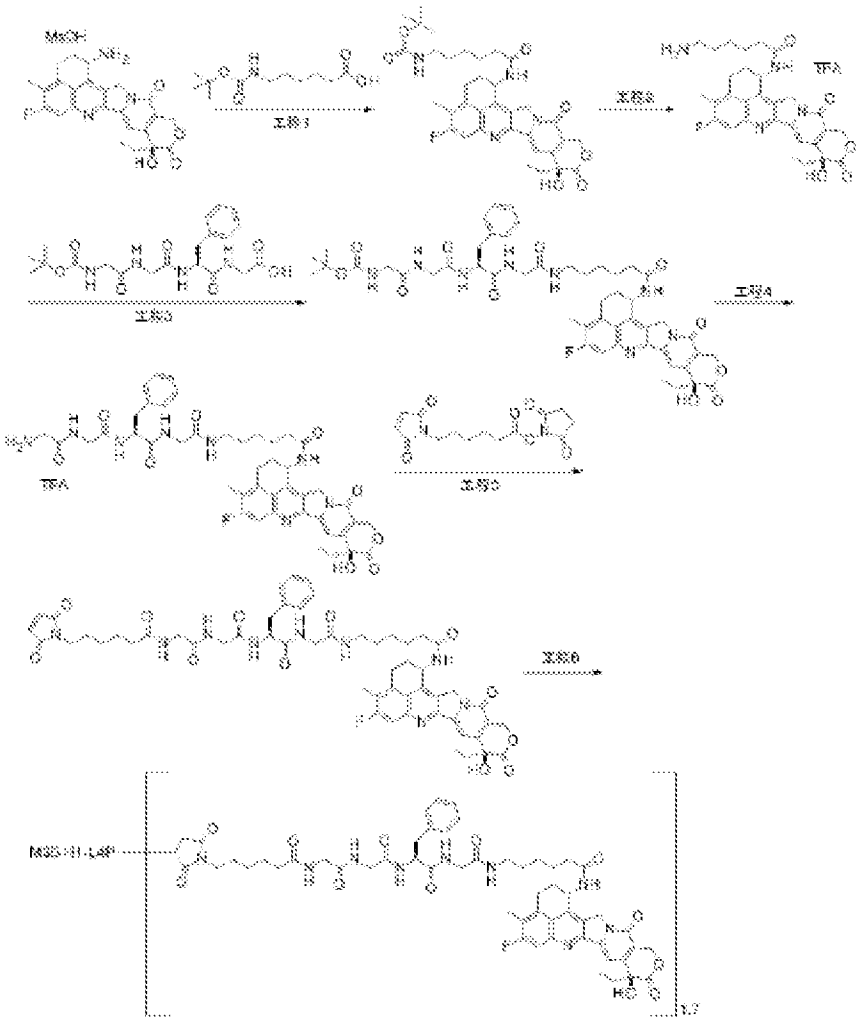
抗体濃度：１３．４７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．４ｍｇ（７５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．１

[0414] 実施例５４　抗体－薬物コンジュゲート（５１）

[0415]

OnCusp
Ex. 1002

[化123]



[0416] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（６－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－６－オキソヘキシル）カーバメート

化合物（４）のメシル酸塩（０．５００ｇ，０．８８２ｍｍｏＬ）を、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりに６－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ヘキサン酸を用いて、実施例１の工程１と同様に反応させ、標記化合物（０．６２０ｇ，定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．８Ｈｚ）

，1．14－1．28（2H，m），1．31（9H，s），1．47－1．61（2H，m），1．75－1．89（2H，m），2．04－2．17（4H，m），2．35（3H，s），2．81－2．88（2H，m），3．09－3．16（2H，m），5．10（1H，d，J＝19．4Hz），5．16（1H，d，J＝19．4Hz），5．39（2H，s），5．48－5．55（1H，m），6．50（1H，s），6．73－6．78（1H，m），7．26（1H，s），7．74（1H，d，J＝10．9Hz），8．39（1H，d，J＝9．0Hz）．

[0417] 工程2：6－アミノ－N－［（1S，9S）－9－エチル－5－フルオロ－9－ヒドロキシ－4－メチル－10，13－ジオキソ－2，3，9，10，13，15－ヘキサヒドロ－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－1－イル］ヘキサンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程1で得た化合物（0．397g，0．611mmoL）を、実施例1の工程2と同様に反応させ、標記化合物（0．342g，84％）を得た。

^{1}H－NMR（DMSO－d_6）δ：0．88（3H，t，J＝7．2Hz），1．31－1．41（2H，m），1．52－1．70（4H，m），1．80－1．94（2H，m），2．05－2．18（2H，m），2．21（2H，t，J＝7．4Hz），2．40（3H，s），2．81（2H，t，J＝7．4Hz），3．10－3．25（2H，m），3．33（2H，brs），5．18（1H，d，J＝19．8Hz），5．22（1H，d，J＝19．8Hz），5．41（2H，d，J＝16．6Hz），5．45（2H，d，J＝16．6Hz），5．53－5．60（1H，m），6．55（1H，s），7．32（1H，s），7．80（1H，d，J＝10．9Hz），8．49（1H，d，J＝9．2Hz）．

[0418] 工程3：N－（tert－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－L－フェニルアラニル－N－（6－｛［（1S，9S）－9－エチル－5－フルオ

ロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－６－オキソヘキシル）グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（０．１７０ｇ，０．５１６ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程１と同様に反応させ、標記化合物（０．２２５ｇ，９１％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．４３－１．７０（６Ｈ，ｍ），１．８７（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１５．０，７．４Ｈｚ），２．１０－２．２２（３Ｈ，ｍ），２．２８－２．３７（１Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．７８－２．８５（１Ｈ，ｍ），３．０１－３．１０（３Ｈ，ｍ），３．１５－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．５４－３．６１（５Ｈ，ｍ），３．６２－３．６９（１Ｈ，ｍ），４．４４－４．５３（１Ｈ，ｍ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４５（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），７．１１－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．６３－７．６９（１Ｈ，ｍ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９０－７．９６（１Ｈ，ｍ），８．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ）．

[0419] 工程４：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（６－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ）－６－オキソヘキシル）グリシンアミド

上記工程３で得た化合物（０．１０５ｇ，０．１０８ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程２と同様に反応させ、標記化合物（０．０６８ｍｇ，６５％）を

得た。

^{1}H－NMR（DMSO－d_6）δ：0．89（3H，t，J＝7．4Hz），1．15－1．67（6H，m），1．79－1．97（2H，m），2．08－2．24（4H，m），2．42（3H，s），2．76－2．82（1H，m），3．00－3．10（5H，m），3．19（1H，s），3．50－3．63（2H，m），3．64－3．76（3H，m），3．84－3．92（1H，m），4．51－4．59（1H，m），5．17（1H，d，J＝19．4Hz），5．24（1H，d，J＝19．4Hz），5．44（2H，s），5．53－5．61（1H，m），6．55（1H，brs），7．15－7．29（5H，m），7．33（1H，s），7．72－7．78（1H，m），7．82（1H，d，J＝11．0Hz），7．96－8．08（2H，m），8．30－8．38（2H，m），8．46－8．56（2H，m）．

〔0420〕工程5：N－［6－（2，5－ジオキソ－2，5－ジヒドロ－1H－ピロール－1－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－L－フェニルアラニル－N－（6－｛［（1S，9S）－9－エチル－5－フルオロ－9－ヒドロキシ－10，13－ジオキソ－2，3，9，10，13，15－ヘキサヒドロ－1H，12H－ベンゾ［de］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－b］キノリン－1－イル］アミノ｝－6－オキソヘキシル）グリシンアミド

上記工程4で得た化合物（58mg，0．060mmol）を、実施例2の工程3と同様に反応させ、標記化合物（39mg，62％）を得た。

^{1}H－NMR（CD_3OD）δ：0．99（3H，t，J＝7．4Hz），1．27（2H，td，J＝11．6，6．1Hz），1．38－1．44（2H，m），1．50－1．63（6H，m），1．65－1．80（2H，m），1．89－1．98（2H，m），2．17－2．25（3H，m），2．26－2．36（3H，m），2．40（3H，s），2．95（1H，dd，J＝14．3，9．2Hz），3．12（1H，dd，J＝1

3．7，5．7Ｈｚ），3．15－3．25（4Ｈ，m），3．44（2Ｈ，t，Ｊ＝7．2Ｈｚ），3．65（1Ｈ，d，Ｊ＝17．2Ｈｚ），3．76（1Ｈ，d，Ｊ＝17．2Ｈｚ），3．79－3．86（4Ｈ，m），4．43（1Ｈ，dd，Ｊ＝8．9，6．0Ｈｚ），5．10（1Ｈ，d，Ｊ＝18．9Ｈｚ），5．25（1Ｈ，d，Ｊ＝18．9Ｈｚ），5．35（1Ｈ，d，Ｊ＝16．6Ｈｚ），5．56（1Ｈ，d，Ｊ＝16．0Ｈｚ），5．60－5．64（1Ｈ，m），6．76（2Ｈ，s），7．12－7．24（6Ｈ，m），7．58（1Ｈ，s），7．60（1Ｈ，d，Ｊ＝10．9Ｈｚ），7．68（1Ｈ，t，Ｊ＝5．7Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）m／ｚ：1060（M＋Ｈ）＋

[0421] 工程６：抗体－薬物コンジュゲート（５１）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ6．0／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１４７ｍＬ；抗体一分子に対して２．３当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に上記工程５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９５ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００５９０ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

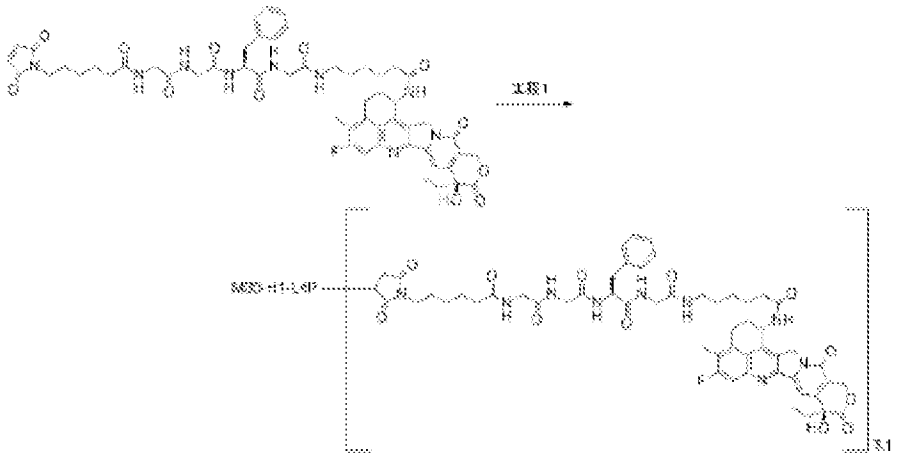
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．８２ｍｇ（５８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：１．７

[0422] 実施例５５　抗体－薬物コンジュゲート（５２）

[0423] [化124]



[0424] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５２）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２９５ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートするこ

とによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例５４の工程５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０５９０ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１８ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

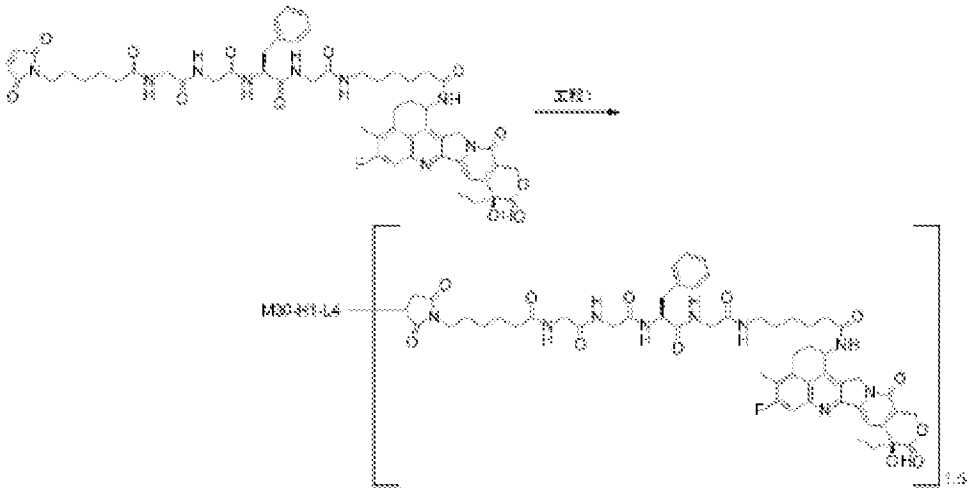
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．６４ｍｇ（５６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．１

[0425] 実施例５６　抗体－薬物コンジュゲート（５３）

[0426] [化125]



[0427] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５３）

抗体の還元：参考例１にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１，６１を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１４７ｍＬ；抗体一分子に対して２．３当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例５４の工程５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９５ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００５９０ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

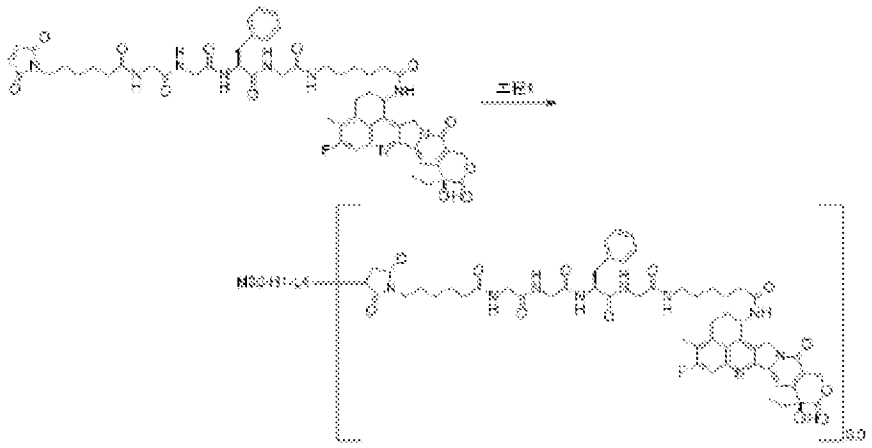
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．２２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．３２ｍｇ（７３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：１．５

[0428] 実施例５７　抗体－薬物コンジュゲート（５４）

OnCusp
Ex. 1002

[0429] [化126]



[0430] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５４）

抗体の還元：参考例１にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．０ｍＬ）を１．５ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２９５ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０５０ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に実施例５４の工程５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０５９０ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃にて４０分間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１８ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰ

OnCusp
Ex. 1002

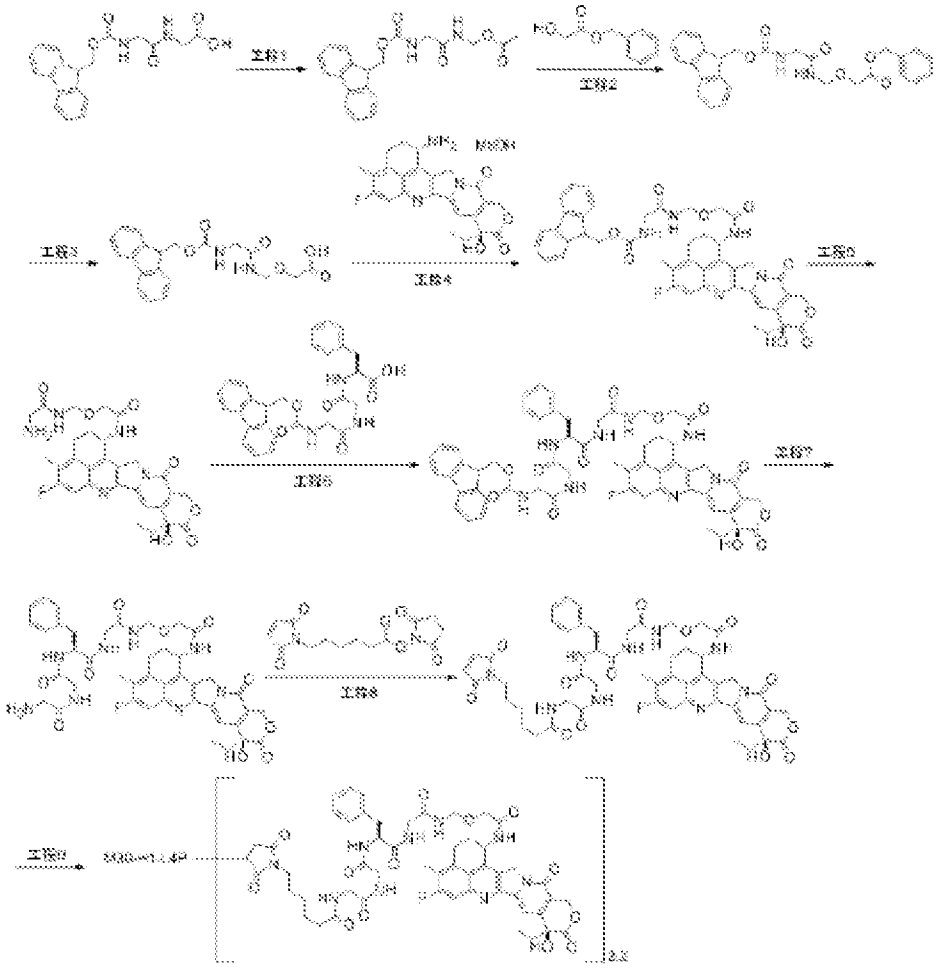
ＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．０６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．３６ｍｇ（６４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０

[0431] 実施例５８　抗体－薬物コンジュゲート（５５）

[0432] [化127]



[0433] 工程１：（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル]

グリシル〕アミノ）メチルアセテート

Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニルグリシルグリシン（４．３３ｇ，１２．２ｍｍｏｌ）、テトラヒドロフラン（１２０ｍｌ）、及びトルエン（４０．０ｍｌ）からなる混合物に、ピリジン（１．１６ｍｌ，１４．７ｍｍｏｌ及び四酢酸鉛（６．８４ｇ，１４．７ｍｍｏｌ）を加え、５時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却した後、不溶物をセライト濾過によって除き、減圧下濃縮した。得られた残留物を酢酸エチルに溶解し、水及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物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＝９：１（ｖ／ｖ）～酢酸エチル］にて精製し、標記化合物（３．００ｇ，６７％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：２．０７（３Ｈ，ｓ），３．９０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），４．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），４．４６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），５．２６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），５．３２（１Ｈ，ｂｒｓ），６．９６（１Ｈ，ｂｒｓ），７．３２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．４１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．５９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．７７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ）．

[0434] 工程２：ベンジル　［（〈Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシル〉アミノ）メトキシ］アセテート

上記工程１で得た化合物（３．６８ｇ，１０．０ｍｍｏＬ）及びベンジルグリコレート（４．９９ｇ，３０．０ｍｍｏＬ）のテトラヒドロフラン（４０．０ｍＬ）溶液に、カリウムｔｅｒｔ－ブトキシド（２．２４ｇ，２０．０ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温にて１５分間撹拌した。反応溶液に酢酸エチル、水を０℃で加え、酢酸エチル、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をジオキサン（４０．０ｍＬ）、水（１０．０ｍＬ）に溶解し、炭酸水素ナトリウム（１．０１ｇ，１２．０ｍｍｏＬ）、クロロぎ酸９－フルオレニ

ルメチル（２．５９ｇ，１０．０ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間撹拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物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＝１００：０（ｖ／ｖ）～０：１００］にて精製し、無色油状の標記化合物（１．８８ｇ、４０％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：３．８４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），４．２４（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），４．４９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），４．８８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．１５－５．２７（１Ｈ，ｍ），５．１９（２Ｈ，ｓ），６．７４（１Ｈ，ｂｒｓ），７．３１－７．３９（７Ｈ，ｍ），７．４３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ）．

〔０４３５〕工程３：［（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシル｝アミノ）メトキシ］酢酸

上記工程２で得た化合物（１．８８ｇ、３．９６ｍｍｏＬ）をエタノール（４０．０ｍＬ）、酢酸エチル（２０．０ｍＬ）に溶解した。パラジウム炭素触媒（３７６ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温にて２時間撹拌した。不溶物をセライト濾過によって除き、溶媒を減圧留去し、標記化合物（１．５２ｇ、定量的）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：３．６２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），３．９７（２Ｈ，ｓ），４．１８－４．３２（３Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），７．２９－７．４６（４Ｈ，ｍ），７．５８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．７２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．９０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

〔０４３６〕工程４：９Ｈ－フルオレン－９－イルメチル（２－｛［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，

１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］アミノ｝－２－オキソエチル）カーバメート

氷冷下、化合物（４）のメシル酸塩（０．２８３ｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（６１．４ｍｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）、及び上記工程３で得た化合物（０．２０５ｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（９２．９μＬ，０．５３３ｍｍｏＬ）及びＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１４３ｇ，０．６９３ｍｍｏＬ）を加え、室温にて３日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．３５２ｇ，８２％）を淡茶色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８１（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７３－１．８７（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２０（２Ｈ，ｍ），２．３４（３Ｈ，ｓ），３．０１－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．５８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），３．９８（２Ｈ，ｓ），４．１３－４．２５（３Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．０９－５．２２（２Ｈ，ｍ），５．３２－５．４２（２Ｈ，ｍ），５．５０－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．４９（１Ｈ，ｓ），７．２４－７．３０（３Ｈ，ｍ），７．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．５３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．６６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），８．７７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：８０２（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0437] 工程５：Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９

ーヒドロキシー４ーメチルー１０，１３ージオキソー２，３，９，１０，１３，１５ーヘキサヒドロー１Ｈ，１２Ｈーベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリンー１ーイル］アミノ｝ー２ーオキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程４で得た化合物（０．８８１ｇ，１．１０ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎージメチルホルムアミド（１１．０ｍＬ）溶液に、ピペリジン（１．１ｍＬ）を加え、室温で２時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。

[0438] 工程６：Ｎー［（９Ｈーフルオレンー９ーイルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシルーＬーフェニルアラニルーＮー［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９ーエチルー５ーフルオロー９ーヒドロキシー４ーメチルー１０，１３ージオキソー２，３，９，１０，１３，１５ーヘキサヒドロー１Ｈ，１２Ｈーベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリンー１ーイル］アミノ｝－２ーオキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

氷冷下、上記工程５で得た混合物（０．４３９ｍｍｏＬ）、Ｎーヒドロキシスクシンイミド（０．１０１ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）、及びＮー［（９Ｈーフルオレンー９ーイルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシルーＬーフェニルアラニン（特開２００２－６０３５１号公報に記載された化合物）（０．４４０ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎージメチルホルムアミド（５０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ’ージシクロヘキシルカルボジイミド（０．１８１ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）を加え、室温にて４日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２６９ｇ，５８％）を淡橙色固体として得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６３（Ｍ＋Ｈ）＋

[0439] 工程７：グリシルグリシルーＬーフェニルアラニルーＮー［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９ーエチルー５ーフルオロー９ーヒドロキシー４ーメチルー１

０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程６で得た化合物（０．２６９ｇ、０．２５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．２５１ｍＬ，２．５３ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。

[0440] 工程８：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程７で得た化合物（０．２５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．１５６ｇ，０．５０６ｍｍｏＬ）を加え、室温で３日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．１００ｇ，３８％）を淡黄色固体として得た。
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．０９－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．３３－１．４７（４Ｈ，ｍ），１．７５－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．００－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．３６（３Ｈ，ｓ），２．６９－２．８１（１Ｈ，ｍ），２．９４－３．０３（１Ｈ，ｍ），３．０６－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．２３－３．７４（８Ｈ，ｍ），３．９８（２Ｈ，ｓ），４．３９－４．５０（１Ｈ

，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．１７（２Ｈ，ｓ），５．３９（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５０（１Ｈ，ｓ），６．９６（２Ｈ，ｓ），７．１１－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．２８（１Ｈ，ｓ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），８．４８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ），８．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０３４（Ｍ＋Ｈ）＋

[0441] 工程９：抗体－薬物コンジュゲート（５５）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＳ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２５ｍＬ；抗体一分子に対して３．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）０．１０９ｍＬと上記工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０３９ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下４０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００８ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

OnCusp
Ex. 1002

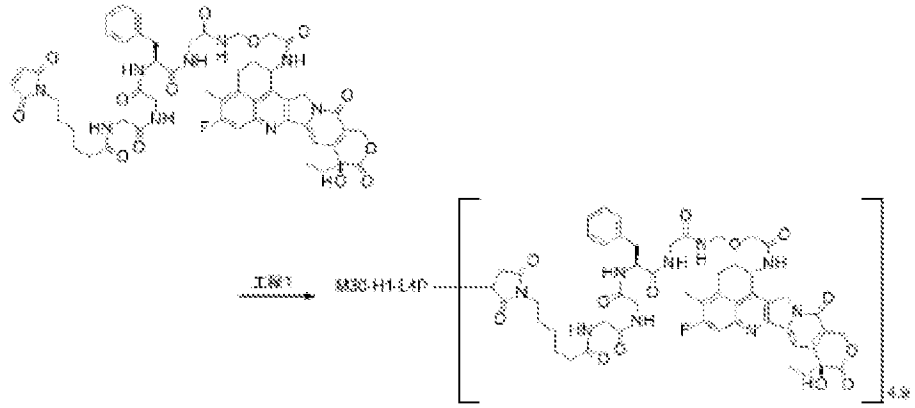
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１２．５７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．８ｍｇ（７０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２

[0442] 実施例５９　抗体－薬物コンジュゲート（５６）

[0443] [化128]



[0444] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５６）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０５１ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内

であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０６７ｍＬ）と実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０８５ｍＬ；抗体一分子に対して１０．０当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３、アズワン株式会社）を用いて室温下６０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１３ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

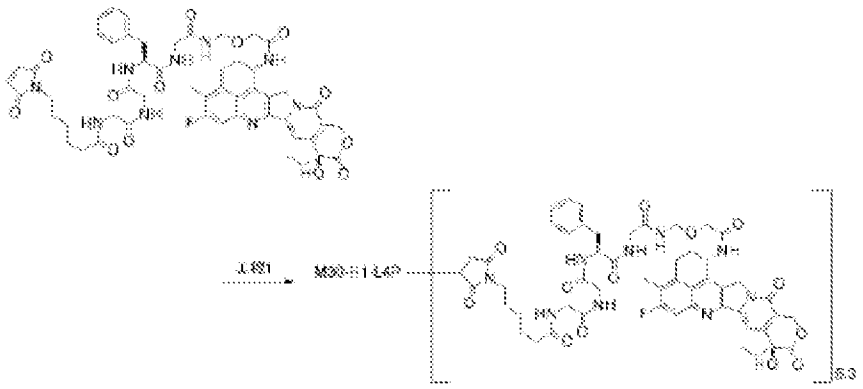
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．３３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．９８ｍｇ（６４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．９

〔0445〕実施例６０　抗体－薬物コンジュゲート（５７）

〔0446〕[化129]



〔0447〕工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５７）

抗体の還元：参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及びＳ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、媒体をＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡに置換し、１０ｍｇ／ｍＬの抗体濃度に調製した。本溶液（１．２５ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０５１ｍＬ；抗体一分子に対して６．０当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．０２５ｍＬ）と実施例５８工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．１２７ｍＬ；抗体一分子に対して１５．０当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下６０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１９ｍＬ）を加え、さらに室温下２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

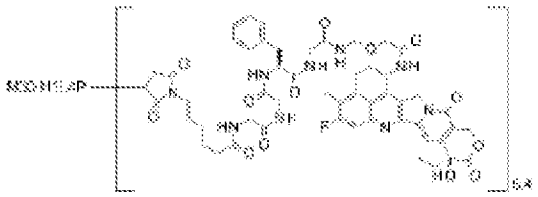
抗体濃度：０．９１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．４６ｍｇ（４４％），抗体

OnCusp
Ex. 1002

一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．３

[0448] 実施例６１　抗体－薬物コンジュゲート（５８）

[0449] [化130]

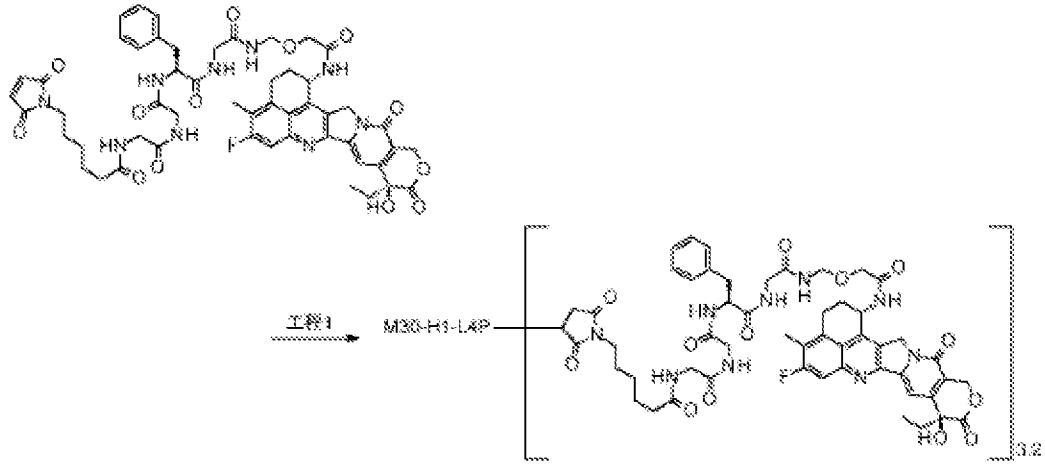


[0450] 実施例５９と実施例６０の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１２．３０ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．４

[0451] 実施例６２　抗体－薬物コンジュゲート（５９）

[0452] [化131]



[0453] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５９）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を，製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１００ｍＬ、抗体１ｇ）を２５０ｍＬフラスコに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（２．４３ｍＬ：抗

体一分子に対して３．６当量）を加え、さらに１Ｍ　リン酸水素二カリウム水溶液（５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４付近であることをｐＨメーターで確認した後、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（３．５１ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）及びジメチルスルホキシド（２．１４ｍＬ）を室温下加え、１５℃水浴中で撹拌子で１３０分撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．５４７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｂｉｏｍａｘ　５０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳを滴下しながら（計８００ｍＬ）、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を約７０ｍＬ得た。

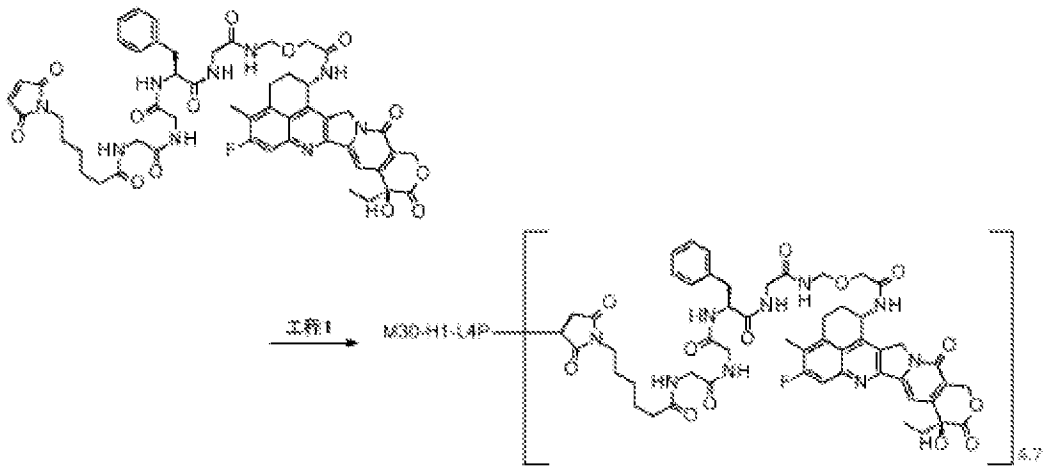
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１４．２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１．０ｇ（約１００％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２

[0454] 実施例６３　抗体－薬物コンジュゲート（６０）

OnCusp
Ex. 1002

[0455] [化132]



[0456] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６０）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（５ｍＬ、抗体５０ｍｇ）を１５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０７５ｍＬ；抗体一分子に対して４当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０付近であることをｐＨメーターで確認した後、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．２１９ｍＬ；抗体一分子に対して６．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０６４ｍＬ）を加え、１５℃水浴中で９０分インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０３３ｍＬ；抗体一分子に対して９．８当量）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

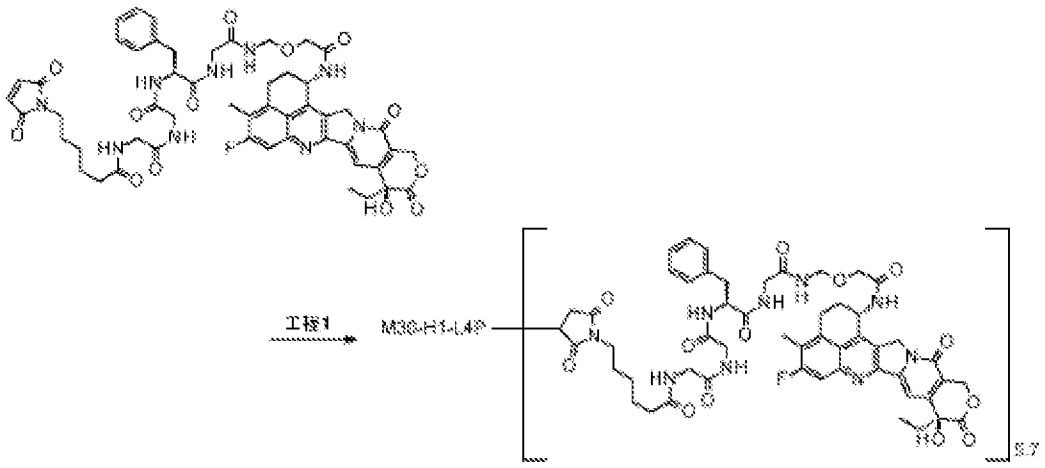
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を１９ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．１９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４２ｍｇ（８３％）、抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．７

[0457] 実施例６４　抗体－薬物コンジュゲート（６１）

[0458] [化133]



[0459] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６１）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（４ｍＬ、抗体４０ｍｇ）を１５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．１４ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０付近であることをｐＨメーターで確認した後、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．２３２ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）を加え、１５℃水浴中で６０分イ

ンキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０３５ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

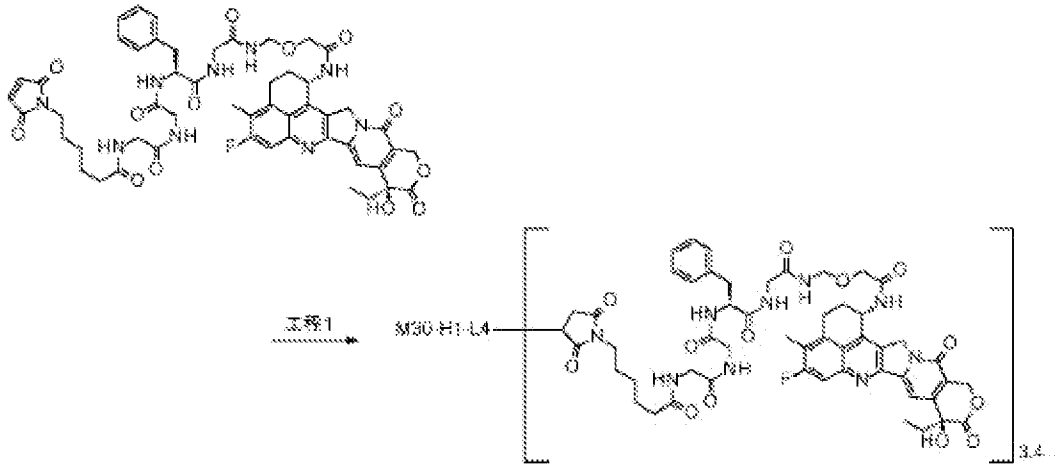
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を１３ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．０３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２６ｍｇ（６６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．７

[0460] 実施例６５　抗体－薬物コンジュゲート（６２）

[0461] [化134]



[0462] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６２）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．２５ｍＬ、抗体１２．５ｍｇ）を１．５ｍＬチュ

ーブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０２８７ｍＬ；抗体一分子に対して３．４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０４３９ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）及びジメチルスルホキシド（０．０２６７ｍＬ）を室温下加え、１５℃の水浴中で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００６６ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

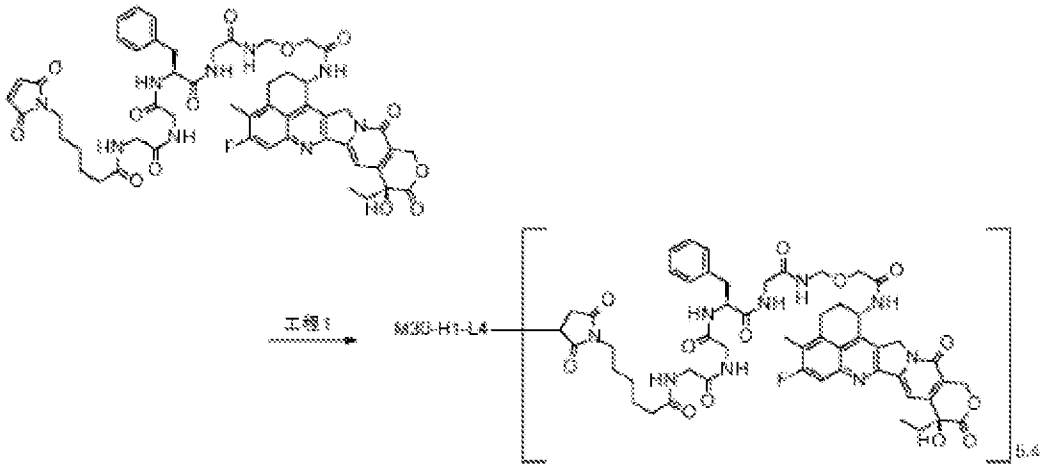
抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．８ｍｇ（６２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0463] 実施例６６　抗体－薬物コンジュゲート（６３）

[0464]

OnCusp
Ex. 1002

[化135]



[0465] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６３）

抗体の還元：参考例1にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（１．２５ｍＬ、抗体１２．５ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０４３９ｍＬ；抗体一分子に対して５．２当量）（０．０２８７ｍＬ；抗体一分子に対して３．４当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．０６２５ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．４±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０７２６ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）を室温下加え、１５℃の水浴中で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０１１ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

OnCusp
Ex. 1002

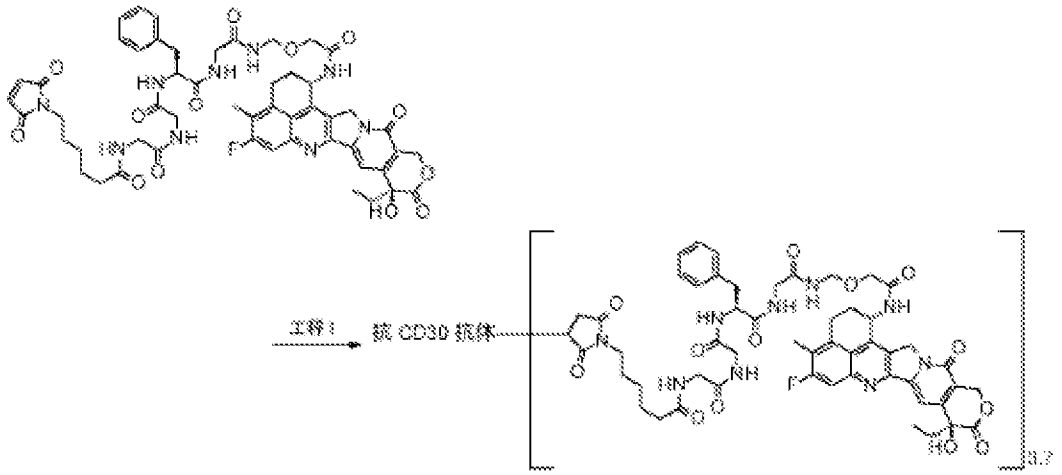
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．３ｍｇ（５８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．４

[0466] 実施例６７　抗体－薬物コンジュゲート（６４）

[0467] [化136]



[0468] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６４）

抗体の還元：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．００６５ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００５８ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間イ

OnCusp
Ex. 1002

ンキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０１１６ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０１０１ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００１７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

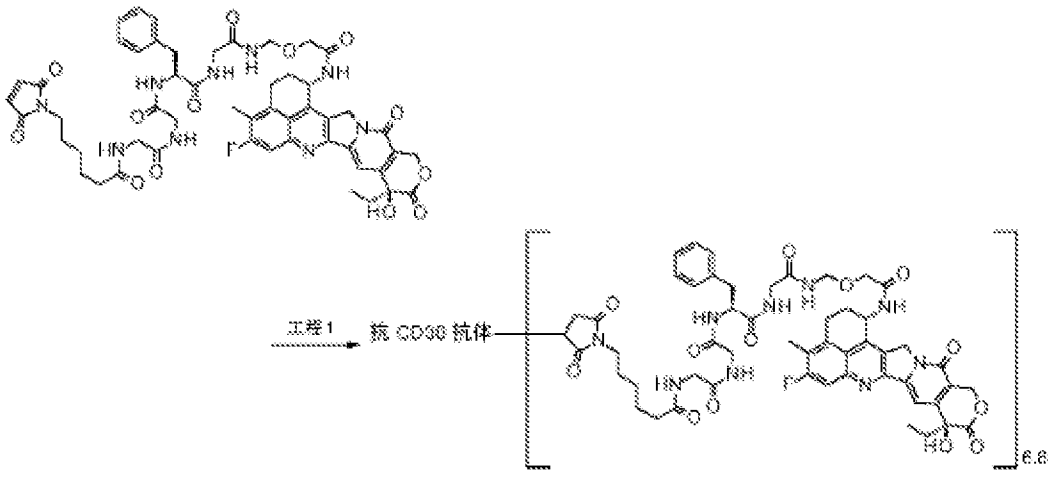
抗体濃度：０．９６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．４ｍｇ（６０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．７

[0469] 実施例６８　抗体－薬物コンジュゲート（６５）

[0470]

OnCusp
Ex. 1002

[化137]



[0471] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６５）

抗体の還元：参考例３にて作製した抗ＣＤ３０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．７５ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１２９ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００６ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２３３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００３５ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡ

OnCusp
Ex. 1002

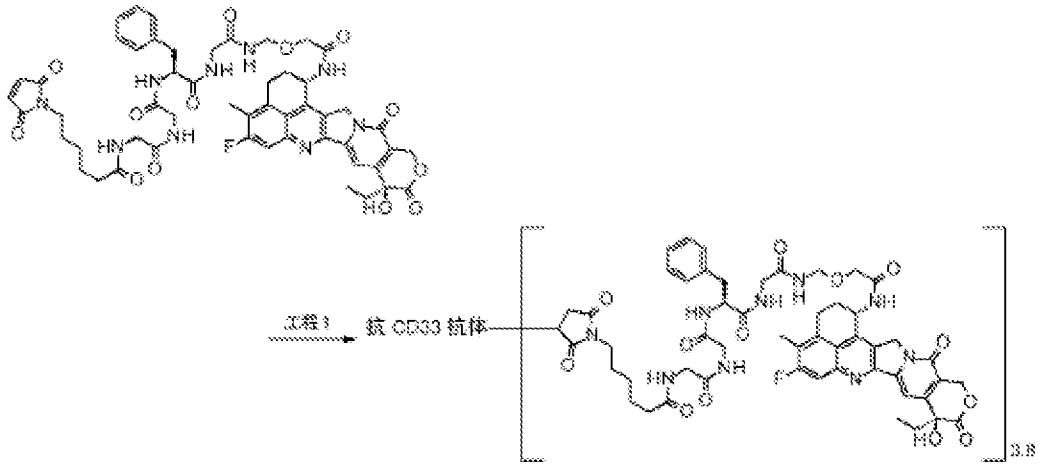
ＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．３９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１．０ｍｇ（２４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．８

[0472] 実施例６９　抗体－薬物コンジュゲート（６６）

[0473] [化138]



[0474] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６６）

抗体の還元：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．００６５ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００５８ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた

OnCusp
Ex. 1002

»

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０１１６ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０１０１ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００１７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

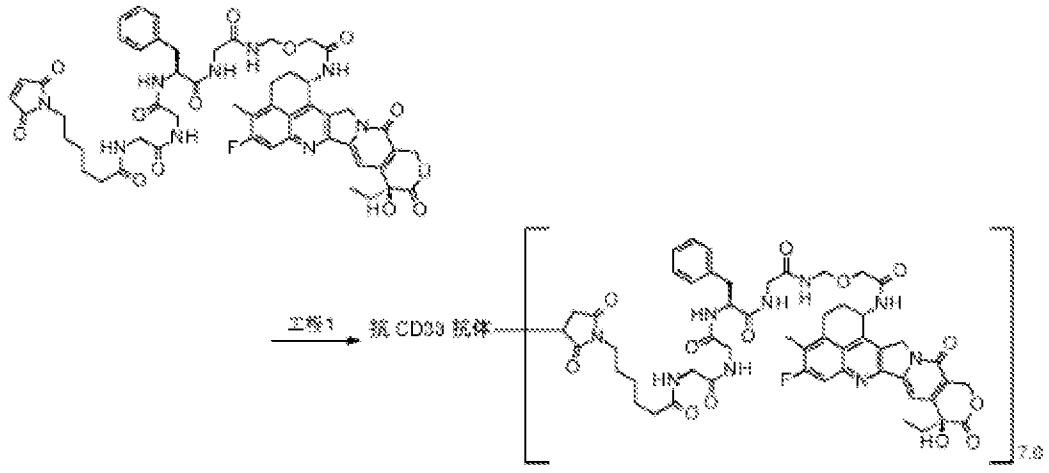
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：３．０ｍｇ（７４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．８

[0475] 実施例７０　抗体－薬物コンジュゲート（６７）

[0476] [化139]



[0477] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６７）

抗体の還元：参考例４にて作製した抗ＣＤ３３抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６６ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１２９ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００６ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２３３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００３５ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

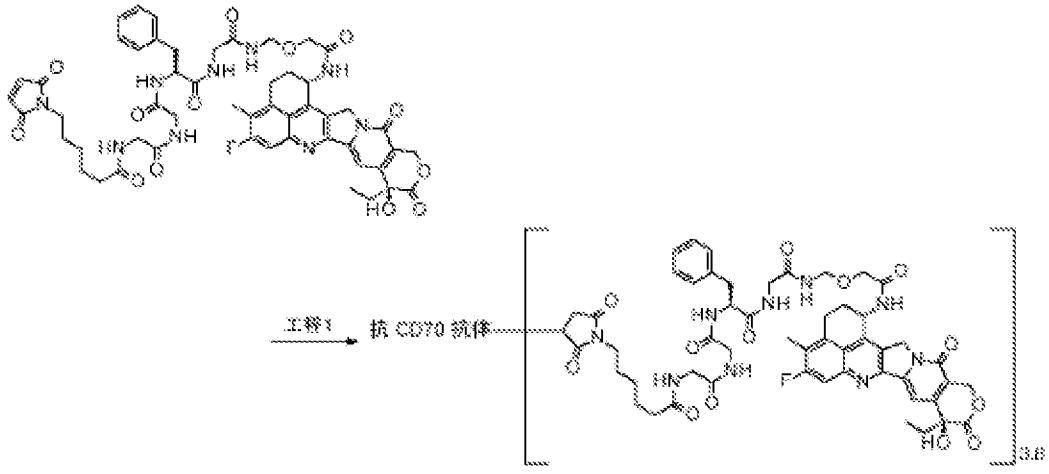
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．２４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：３．１ｍｇ（７８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．０

[0478] 実施例７１　抗体－薬物コンジュゲート（６８）

OnCusp
Ex. 1002

[0479] [化140]



[0480] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６８）

抗体の還元：参考例５にて作製した抗ＣＤ７０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．００６５ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００５８ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０１１６ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）及びジメチルスルホキシド（０．０１０１ｍＬ）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００１７ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

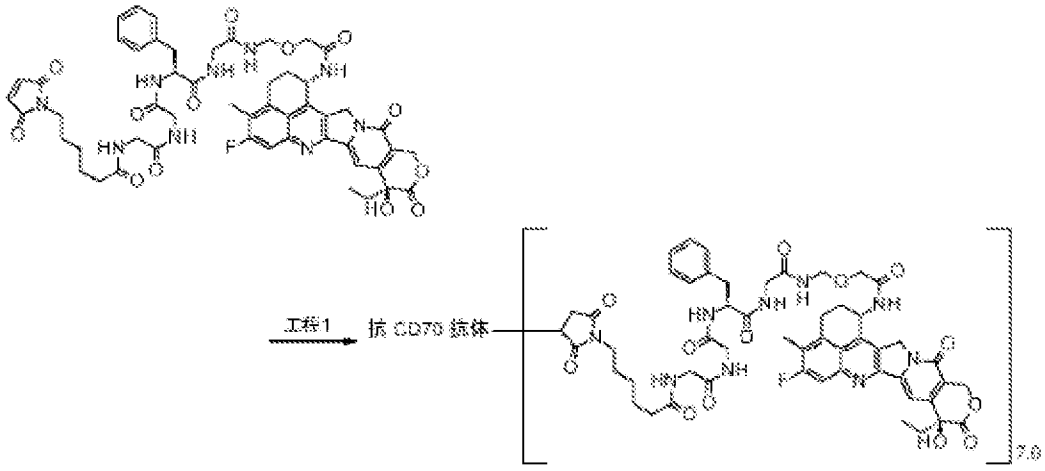
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．８ｍｇ（６９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．８

[0481] 実施例７２　抗体－薬物コンジュゲート（６９）

[0482] [化141]



[0483] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（６９）

抗体の還元：参考例５にて作製した抗ＣＤ７０抗体を、製造方法１に記載した共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．６９ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）及びＣ－１を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（０．４ｍＬ、抗体４ｍｇ）を１．５ｍＬチューブに入れ、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１２９ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．００６ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュ

ペートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液に対して、実施例５８の工程８で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２３３ｍＬ；抗体一分子に対して９当量）を室温下加え、チューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３，アズワン株式会社）を用いて室温下１時間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．００３５ｍＬ）を加え、さらに室温にて２０分間インキュベートし、薬物リンカーの反応を停止させた。

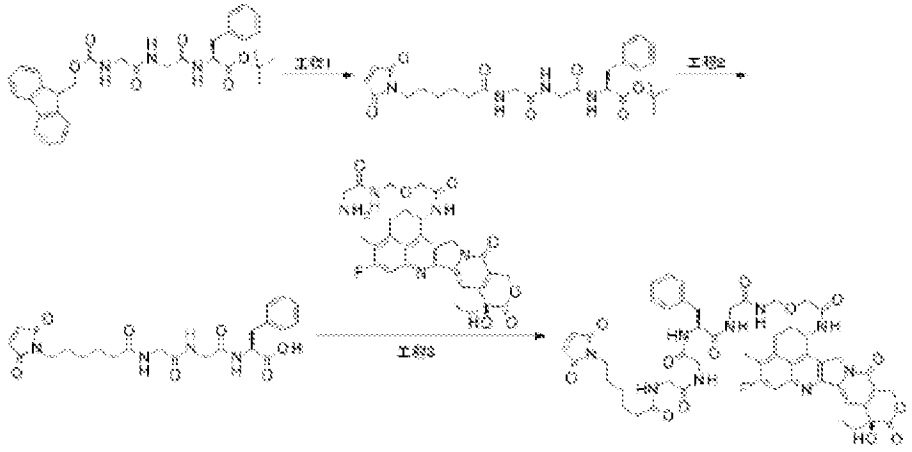
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２．５ｍＬ得た。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２．９ｍｇ（７３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．０

[0484] 実施例７３（実施例５８の工程８の化合物の別途合成法）

[0485] [化142]



OnCusp
Ex. 1002

[0486] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　Ｎ－〔６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル〕グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニネート

氷冷下、ｔｅｒｔ－ブチル　Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニネート（Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，１９９９年，５３巻，３９３項）（０．４００ｇ，０．７１７ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（１２．０ｍｌ）溶液に、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］－７－ウンデセン（０．４００ｍｌ）を加えて室温で４日間撹拌した後、更に６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．２２１ｇ，０．７１７ｍｍｏＬ）を加え、３時間撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、１０％クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２９５ｇ，７８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：１．２８－１．３６（２Ｈ，ｍ），１．４１（９Ｈ，ｓ），１．５７－１．７１（４Ｈ，ｍ），２．２３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），３．０９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），３．５１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），３．８５－４．０２（４Ｈ，ｍ），４．６９－４．７８（１Ｈ，ｍ），６．１５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝４．６Ｈｚ），６．３３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），６．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．０Ｈｚ），６．６８（２Ｈ，ｓ），７．１０－７．１６（２Ｈ，ｍ），７．２２－７．３１（３Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５２９（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0487] 工程２：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニン

上記工程１で得た化合物（０．２９５ｇ，０．５５８ｍｍｏＬ）のジクロロメタン（８．００ｍｌ）溶液に、トリフルオロ酢酸（４．００ｍＬ）を加

え、室温にて１８時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物（０．２４０ｇ，９１％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：１．１５－１．２３（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５３（４Ｈ，ｍ），２．１０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．８８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，８．９Ｈｚ），３．０４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，５．０Ｈｚ），３．３５－３．４３（２Ｈ，ｍ），３．５８－３．７７（４Ｈ，ｍ），４．４１（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝７．８，５．０Ｈｚ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１６－７．３１（５Ｈ，ｍ），８．００（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ）．

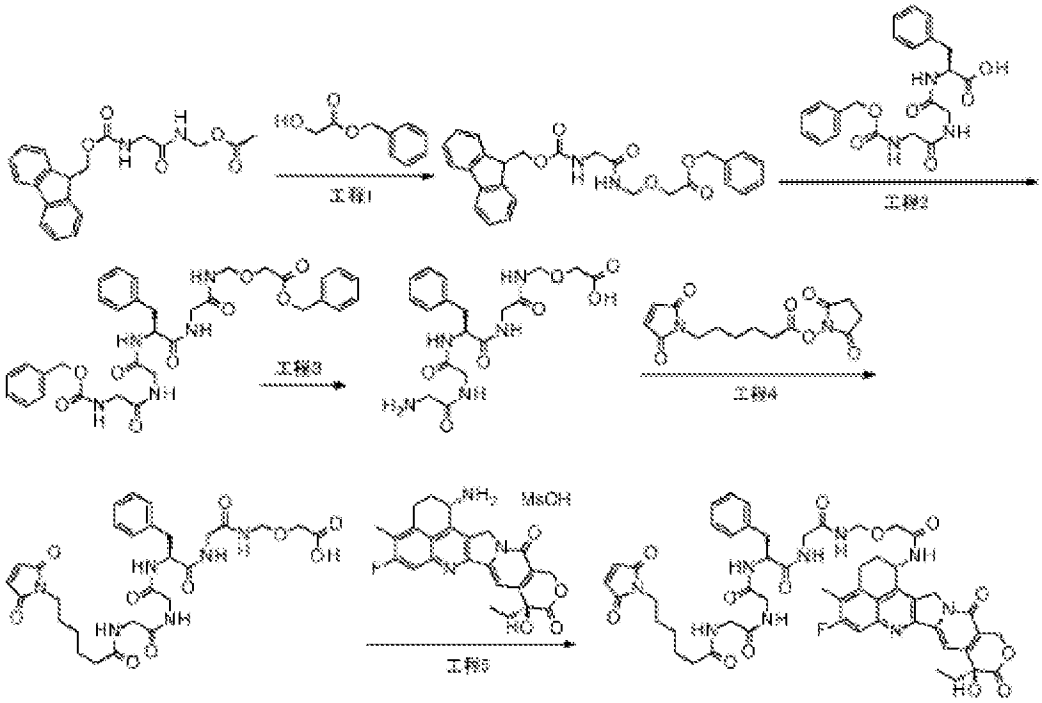
[0488] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（０．５７２ｇ，１．２１ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１２．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１５２ｇ，１．３２ｍｍｏＬ）及び、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（０．２５３ｇ，１．３２ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。その反応溶液を実施例５８の工程５で得た混合物（１．１０ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２２．０ｍＬ）溶液に加え、室温にて３時間撹拌した。反応溶液に１０％クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．３５１ｇ，３１％）を淡黄色固体として得た。機器

データは、実施例５８の工程８の化合物と同様であった。

[0489] 実施例７４（実施例５８の工程８の化合物の別途合成法）

[0490] [化143]



[0491] 工程１：ベンジル［（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシル｝アミノ）メトキシ］アセテート

実施例５８の工程１で得た化合物（７．３７ｇ，２０．０ｍｍｏＬ）のテトラヒドロフラン（２００ｍｌ）溶液に、ベンジルグリコレート（６．６５ｇ，４０．０ｍｍｏＬ）、およびｐ－トルエンスルホン酸一水和物（０．３８１ｇ，２．００ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温にて２時間３０分間撹拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物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＝１００：０（ｖ／ｖ）～０：１００］にて精製し、標記化合物（６．７５ｇ，７１％）を無色固体として得た。機器データは、実施例５８の工程２の化合物と同様であった。

[0492] 工程２：Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フ

OnCusp
Ex. 1002

ェニルアラニン－Ｎ－｛［（２－（ベンジルオキシ）－２－オキソエトキシ］メチル）グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（６．６０ｇ，１３．９ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１４０ｍＬ）溶液に、１，８-ジアザビシクロ［５，４，０］ウンデカ－７－エン（２．２２ｇ，１４．６ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温にて１５分間撹拌した。反応溶液に、Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニン（６．３３ｇ，１５．３ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（１．９２ｇ、１６．７ｍｍｏＬ）および、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（３．２０ｇ、１６．７ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１４０ｍＬ）溶液を、あらかじめ室温にて、１時間撹拌したものを加え、室温にて、４時間撹拌した。反応溶液に０．１規定塩酸を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（７．１０ｇ，７９％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－Ｄ$_6$）δ：２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，９．６Ｈｚ），３．０５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．５６－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．１５（２Ｈ，ｓ），４．４７－４．５５（１Ｈ，ｍ），４．６３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），５．０３（２Ｈ，ｓ），５．１５（２Ｈ，ｓ），７．１６－７．３８（１５Ｈ，ｍ），７．５２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．３６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．６１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ）．

[0493] 工程３：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（カルボキシメトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（７．００ｇ，１０．８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２１６ｍＬ）溶液に，パラジウム炭素触媒（７．００

g）を加え、水素雰囲気下、室温にて２４時間撹拌した。不溶物をセライト濾過により除き、溶媒を減圧留去した。得られた残留物を水に溶解し、不溶物をセライト濾過により除き、溶媒を減圧留去する操作を２回繰り返し、標記化合物（３．７７ｇ，８２％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－Ｄ$_6$）δ：２．８４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．７Ｈｚ），３．５０－３．７２（４Ｈ，ｍ），３．７７－３．８６（２Ｈ，ｍ），３．８７（２Ｈ，ｓ），４．５２－４．４３（１Ｈ，ｍ），４．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），７．１２－７．３０（５Ｈ，ｍ），８．４３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），８．７９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ）．

[0494] 工程４：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（カルボキシメトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程３で得た化合物（３．５９ｇ，８．４８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（８５．０ｍＬ）溶液に，６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（２．８８ｇ，９．３３ｍｍｏＬ），およびトリエチルアミン（０．８５８ｇ，８．４８ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間撹拌した。反応溶液に０．１規定塩酸を加え、クロロホルム、およびクロロホルムとメタノールの混合溶媒［クロロホルム：メタノール＝４：１（ｖ／ｖ）］で抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（３．７０ｇ，７１％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－Ｄ$_6$）δ：１．１３－１．２４（２Ｈ，ｍ），１．４２－１．５３（４Ｈ，ｍ），２．１１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），２．８０（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０６（１Ｈ，ｄｄ

，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．３７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），３．５６－３．７８（６Ｈ，ｍ），３．９７（２Ｈ，ｓ），４．４６－４．５３（１Ｈ，ｍ），４．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２９（５Ｈ，ｍ），８．０３－８．２０（３Ｈ，ｍ），８．３２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ）．

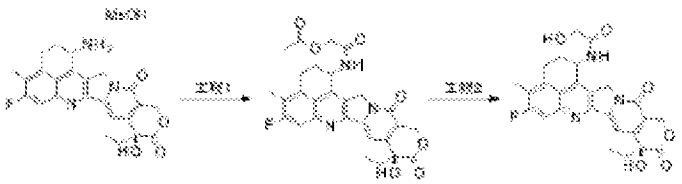
[0495] 工程５：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

化合物（４）のメシル酸塩（１．１４ｇ，２．００ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４０．０ｍＬ）溶液に、トリエチルアミン（０．２０２ｇ，２．００ｍｍｏＬ），上記工程４で得た化合物（１．４８ｇ，２．４０ｍｍｏＬ），および１６．４％含水の４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウム　クロリド（０．９９３ｇ，３．００ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温にて1時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（１．６９ｇ，８２％）を淡黄色固体として得た。機器データは、実施例５８の工程８の化合物と同様であった。

[0496] 実施例７５　Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－２－ヒドロキシアセトアミド

OnCusp
Ex. 1002

[0497] [化144]



[0498] 工程１：２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエチルアセテート

氷冷下、化合物（４）のメシル酸塩（０．５００ｇ，０．９４１ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２０．０ｍＬ）懸濁液に、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．４９２ｍＬ，２．８２ｍｍｏＬ）及びアセトキシアセチルクロリド（０．１２１ｍｌ，１．１３ｍｍｏＬ）を加え、室温にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．５０５ｇ，定量的）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８１－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０８（３Ｈ，ｓ），２．０８－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），３．１４－３．２１（２Ｈ，ｍ），４．５１（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１９．４，１４．７Ｈｚ），５．２２（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝４０．１，１９．０Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５６－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．６７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５３６（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0499] 工程２：Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキ

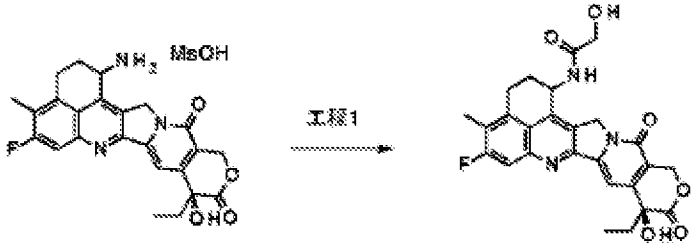
シー４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－２－ヒドロキシアセトアミド

上記工程１で得た化合物（０．５０４ｇ、０．９４１ｍｍｏＬ）のメタノール（５０．０ｍＬ）懸濁液に、テトラヒドロフラン（２０．０ｍｌ）及び１規定水酸化ナトリウム水溶液（４．００ｍｌ，４．００ｍｍｏＬ）を加え、室温にて１時間撹拌した。１規定塩酸（５．００ｍｌ，５．００ｍｍｏＬ）を加えて反応を停止し、溶媒を減圧留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．４１２ｇ，８９％）を淡黄色固体として得た。抗体－薬物コンジュゲート（５５）、（５６）を担癌マウスに投与した際に、この化合物が腫瘍中で確認された。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７８－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０９－２．２８（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），３．０７－３．２７（２Ｈ，ｍ），３．９６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），５．１１－５．２６（２Ｈ，ｍ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．４６－５．５４（１Ｈ，ｍ），５．５５－５．６３（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：４９４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

［０５００］実施例７６（実施例７５の化合物の別途合成法）

［０５０１］［化145］



工程１：Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－２－ヒドロキシアセトアミド

グリコール酸（０．０２０１ｇ，０．２７ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．０３０２ｇ、０．２７ｍｍｏＬ）及び、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（０．０５０８ｇ、０．２７ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。その反応溶液を化合物（４）のメシル酸塩（０．１ｇ，０．１７６ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．０ｍＬ）懸濁液に、トリエチルアミン（０．０２５ｍＬ，０．１８ｍｍｏＬ）を加え、室温にて２４時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝１０：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．０８０ｇ，９２％）を淡黄色固体として得た。機器データは、実施例７５の工程２で得た化合物と同様であった。

［０５０２］（試験例１）全長ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１発現ベクターの作製

ＬＮＣａＰ細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ：ＡＴＣＣ）ｔｏｔａｌ　ＲＮＡより合成したｃＤＮＡを鋳型にプライマーセット：プライマー１：

５’－ｃｔａｔａｇｇｇａｇａｃｃｃａａｇｃｔｇｇｃｔａｇｃａｔｇｃｔｇｃｇｔｃｇｇｃｇｇｇｇｃａｇ－３’（配列番号２２）

及び、プライマー２：

５’－ａａｃｇｇｇｃｃｃｔｃｔａｇａｃｔｃｇａｇｃｇｇｃｃｇｃｔｃａｇｇｃｔａｔｔｔｃｔｔｇｔｃｃａｔｃａｔｃｔｔｃｔｔｔｇｃｔｇｔｃａｇ－３’（配列番号２３）

を用いてＰＣＲ反応を行い、ヒトＢ７－Ｈ３バリアント１をコードするｃＤ

ＮＡを増幅した。

次に、得られたＰＣＲ産物をＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　ＰＣＲ　＆　Ｇｅｌ　ｃｌｅａｎｕｐ（ＴＯＹＯＢＯ社）にて精製した。更に、制限酵素（ＮｈｅＩ／ＮｏｔＩ）で消化した後、ＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　ＰＣＲ＆Ｇｅｌ　ｃｌｅａｎｕｐ（ＴＯＹＯＢＯ社）にて精製した。ｐｃＤＮＡ３．１（＋）プラスミドＤＮＡ（ライフテクノロジー社）を同じ制限酵素（ＮｈｅＩ／ＮｏｔＩ）で消化した後、ＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　ＰＣＲ　＆Ｇｅｌ　ｃｌｅａｎｕｐ（ＴＯＹＯＢＯ社）にて精製した。

上記精製ＤＮＡ溶液を混合し、更にＬｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（ＴＯＹＯＢＯ社）を加え、１６℃で８時間インキュベートし、ライゲーションした。

上記反応物を大腸菌ＤＨ５αコンピテントセル（ライフテクノロジー社）に加え、形質転換した。

上記で得られたコロニーについて、ＰＣＲプライマーとＢＧＨ　ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｐｒｉｍｅｒでコロニーダイレクトｐｃｒを行い、候補クローンをセレクションした。

得られた候補クローンを液体培地（ＬＢ／Ａｍｐ）で培養し、ＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ－Ｐｌａｓｍｉｄ－（ＴＯＹＯＢＯ社）でプラスミドＤＮＡを抽出した。

得られたプラスミドＤＮＡを鋳型に

プライマー３（ＣＭＶ　ｐｒｏｍｏｔｅｒプライマー）：

５’－ｃｇｃａａａｔｇｇｇｃｇｇｔａｇｇｃｇｔｇ－３’（配列番号２４）

及び、プライマー４（ＢＧＨ　ｒｅｖｅｒｓｅプライマー）：

５’－ｔａｇａａｇｇｃａｃａｇｔｃｇａｇｇ－３’（配列番号２５）

間のシーケンス解析を行い、取得クローンと提供ＣＤＳ配列を比較した。

配列を確認後、得られたクローンを２００ｍＬのＬＢ／Ａｍｐ培地で培養し、ＶｉｏＧｅｎｅ社　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｍｉｄｉ　Ｖ－１００キットを使

って、プラスミドＤＮＡの抽出を行った。

本ベクターをｐｃＤＮＡ３．１－Ｂ７－Ｈ３と命名した。本ベクターにクローニングされたＢ７－Ｈ３バリアント１遺伝子のＯＲＦ部分の配列は配列表の配列番号２６（図１６）のヌクレオチド番号１乃至１６０２に示されている。また、Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列は配列表の配列番号１に示されている。

[0503] （試験例２）Ｂ７－Ｈ３バリアント１遺伝子安定発現ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞の調製

試験例１で作製されたｐｃＤＮＡ３．１－Ｂ７－Ｈ３を、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞（ＡＴＣＣ）にＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　ＩＩ（ロンザ社製）を用い電気穿孔法にてトランスフェクションした。その後、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）含有ＲＰＭＩ１６４０培地（ライフテクノロジー社）（以降１０％ＦＢＳ－ＲＰＭＩ１６４０）中で３７℃、５％CO_2の条件下で更に２晩培養した。

２日間培養後、ｐｃＤＮＡ３．１－Ｂ７－Ｈ３が安定的に組み込まれたＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞を選択するため、７５０μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８（ライフテクノロジー社）含有１０％ＦＢＳ－ＲＰＭＩ１６４０にて培養を開始した。

１ヶ月間培養後、単一細胞クローンを得るため限界希釈法を用いクローニングを行った。具体的には、Ｇ４１８に対する耐性を持ち合わせた細胞を１０ｃｅｌｌ／ｍＬに希釈し９６ｗｅｌｌプレートに１００μＬ／ｗｅｌｌの濃度にて播種、培養し、個別のｗｅｌｌから増殖した細胞を回収した。

回収された各クローンのＢ７－Ｈ３発現を確認するためには、フローサイトメトリー法を用いた。具体的には、回収された各クローンを５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１０μｇ／ｍＬ　Ｍ３０を含む５％ＦＢＳ含有ＰＢＳを加え懸濁し、４℃で３０分間静置した。５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで１０００倍に希釈したＦｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｇｏａｔ　ＩｇＧ　ｆｒａｃｔｉｏｎ

OnCusp
Ex. 1002

ｔｏ ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ（Ｗｈｏｌｅ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ）（ＩＣＮ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社製 ＃５５４９３）を加えて懸濁し、４℃で３０分間静置した。５％ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００：ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ社）で検出を行った。

本操作によって得られた、Ｂ７－Ｈ３バリアント１遺伝子安定発現ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞をＣＥＭ／Ｖ１３．１２細胞と命名した。親株であるＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞はＢ７－Ｈ３非発現細胞株として使用した。

〔0504〕（試験例３）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（１）

試験例２で作製されたＣＥＭ／Ｖ１３．１２細胞、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。ＣＥＭ／Ｖ１３．１２細胞、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞を培地で8×10^4ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、６５μＬの培地を入れた９６穴細胞培養用マイクロプレートに２５μＬずつ添加して一晩培養した。翌日、培地で１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び抗体－薬物コンジュゲートをマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％CO_2下で３日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（$LOG_{10}b-LOG_{10}a$）÷（ｄ－ｃ）＋$LOG_{10}b$）

ａ：被検物質の濃度a

ｂ：被検物質の濃度b

ｃ：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１０）

ＣＥＭ＿Ｖ１＿３、１＿２細胞に対して、抗体－薬物コンジュゲート（５）、（１６）、（２１）、（３２）、（４４）、（４５）、（４６）、（５２）、（５４）は、IC_{50}＜０．１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。抗体－薬物コンジュゲート（１）、（１２）、（１３）、（２０）、（２８）、（２９）、（３５）、（３６）、（３７）、（４１）、（４９）、（５３）は、０．１＜IC_{50}＜１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。抗体－薬物コンジュゲート（３３）、（３４）、（４７）、（４８）、（５０）、（５１）は、１＜IC_{50}＜１００（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。一方、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞に対しては上記のいずれの抗体－薬物コンジュゲートも細胞傷害活性を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４抗体およびＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体はいずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

〔0505〕（試験例４）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（２）

抗原陽性細胞のＳＲ細胞（ＡＴＣＣ）、抗原陰性細胞のＤａｕｄｉ細胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。ＳＲ細胞、Ｄａｕｄｉ細胞を培地で２．８×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、９６穴細胞培養用マイクロプレートに９０μＬずつ添加した。２時間後、培地で４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、３２０ｐＭ、６４ｐＭ、１２．８ｐＭ、２．６ｐＭに希釈した抗ＣＤ３０抗体及び抗体－薬物コンジュゲート（６）、（７）

をマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％CO_2下で３日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（LOG_{10}ｂ－LOG_{10}ａ）÷（ｄ－ｃ）＋LOG_{10}ｂ）

ａ：被検物質の濃度a

ｂ：被検物質の濃度b

ｃ：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１２）

抗体－薬物コンジュゲート（６）、（７）は、ＳＲ細胞に対してIC_{50}＜０．０１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。一方、Ｄａｕｄｉ細胞に対しては抗体－薬物コンジュゲート（６）、（７）は細胞傷害活性を示さなかった（＞４．０（ｎＭ））。また、抗ＣＤ３０抗体はいずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示さなかった（＞４．０（ｎＭ））。

[0506] （試験例５）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（３）

抗原陽性細胞のＳＲ細胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。ＳＲ細胞を培地で２．８×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、９６穴細胞培養用マイクロプレートに９０μＬずつ添加した。２時間後、培

OnCusp
Ex. 1002

地で１０００ｎＭ、１００ｎＭ、１０ｎＭ、１ｎＭ、１００ｐＭ、１０ｐＭ、１ｐＭに希釈した抗ＣＤ３０抗体及び抗体－薬物コンジュゲート（２２）、（２３）、（３８）、（６４）、（６５）をマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％CO_2下で６日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（$LOG_{10}b-LOG_{10}a$）÷（ｄ－ｃ）＋$LOG_{10}b$）

ａ：被検物質の濃度ａ

ｂ：被検物質の濃度ｂ

ｃ：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１２）

抗体－薬物コンジュゲート（２３）、（３８）、（６４）、（６５）は、ＳＲ細胞に対してIC_{50}＜０．０１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。抗体－薬物コンジュゲート（２２）はＳＲ細胞に対してIC_{50}＜０．１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。また、抗ＣＤ３０抗体はＳＲ細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった（＞４．０（ｎＭ））。

[0507] （試験例６）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（４）

抗原陽性細胞のＨＬ－６０細胞（ＡＴＣＣ）、抗原陰性細胞のＲａｊｉ細

胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。ＨＬ－６０細胞、Ｒａｊｉ細胞を培地で８×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、６５μＬの培地を入れた９６穴細胞培養用マイクロプレートに２５μＬずつ添加した。培地で１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈した抗ＣＤ３３抗体及び抗体－薬物コンジュゲート（８）、（９）をマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％CO_2下で３日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（$LOG_{10}b-LOG_{10}a$）÷（ｄ－ｃ）＋$LOG_{10}b$）

ａ：被検物質の濃度ａ

ｂ：被検物質の濃度ｂ

ｃ：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝５）

抗体－薬物コンジュゲート（８）、（９）は、ＨＬ－６０細胞に対してはIC_{50}＜０．１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。一方、Ｒａｊｉ細胞に対しては抗体－薬物コンジュゲート（８）、（９）は細胞傷害活性を示さなか

った（＞１００（ｎＭ））。また、抗ＣＤ３３抗体は、いずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0508]（試験例７）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（５）

抗原陽性細胞のＮＯＭＯ－１細胞（ＨＳＲＲＢ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。ＮＯＭＯ－１細胞を培地で２．８×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、９６穴細胞培養用マイクロプレートに９０μＬずつ添加した。２時間後、培地で１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈した抗ＣＤ３３抗体及び抗体－薬物コンジュゲート（２４）、（２５）、（６７）をマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％CO_2下で６日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（LOG_{10}ｂ－LOG_{10}ａ）÷（ｄ－ｃ）＋LOG_{10}ｂ）

ａ：被検物質の濃度ａ

ｂ：被検物質の濃度ｂ

ｃ：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝５）

ＮＯＭＯ－１細胞に対して、抗体－薬物コンジュゲート（２５）は、ＩＣ$_{50}$＜０．１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。抗体－薬物コンジュゲート（２４）、（６７）は、１＜ＩＣ$_{50}$＜１００（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。また、抗ＣＤ３３抗体は、ＮＯＭＯ－１細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

〔0509〕（試験例８）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（６）

抗原陽性細胞のＵ２５１細胞（ＡＴＣＣ）、抗原陰性細胞のＭＣＦ－７細胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。Ｕ２５１細胞、ＭＣＦ－７細胞を培地で２．８×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、９６穴細胞培養用マイクロプレートに９０μＬずつ添加して一晩培養した。翌日、各培地で１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈した抗ＣＤ７０抗体及び抗体－薬物コンジュゲート（１０）、（１１）をマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％ＣＯ$_{2}$下で６日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。ＩＣ$_{50}$値は次式で算出した。

ＩＣ$_{50}$（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（ＬＯＧ$_{10}$ｂ－ＬＯＧ$_{10}$ａ）÷（ｄ－ｃ）＋ＬＯＧ$_{10}$ｂ）

ａ：被検物質の濃度ａ

ｂ：被検物質の濃度ｂ

ｃ：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１２）

抗体－薬物コンジュゲート（１０）、（１１）は、Ｕ２５１細胞に対してIC_{50}＜１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。一方、ＭＣＦ－７細胞に対しては抗体－薬物コンジュゲート（１０）、（１１）は細胞傷害活性を示さなかった（≧９０（ｎＭ））。また、抗ＣＤ７０抗体は、いずれの細胞に対しても細胞傷害活性を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0510] （試験例９）抗体－薬物コンジュゲートの細胞傷害性試験（７）

抗原陽性細胞のＵ２５１細胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。Ｕ２５１細胞を培地で２．８×10^4ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、９６穴細胞培養用マイクロプレートに９０μＬずつ添加した。2時間後、培地で１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈した抗ＣＤ７０抗体及び抗体－薬物コンジュゲート（２６）、（２７）、（４０）、（６８）、（６９）をマイクロプレートに１０μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７度、５％CO_2下で６日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し攪拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（LOG_{10}ｂ－LOG_{10}ａ）÷（ｄ－ｃ）＋LOG_{10}ｂ）

ａ：被検物質の濃度ａ

ｂ：被検物質の濃度ｂ

c：濃度ａの被検物質を添加した時の生細胞率

d：濃度ｂの被検物質を添加した時の生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

各濃度における細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１２）

抗体－薬物コンジュゲート（２６）、（２７）、（４０）、（６９）はＵ２５１細胞に対して１＜IC_{50}＜１０（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。抗体－薬物コンジュゲート（６８）は１０＜IC_{50}＜１００（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。また、抗ＣＤ７０抗体は、Ｕ２５１細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0511] （試験例１０）遊離薬物の細胞傷害性試験（８）

Ａ３７５細胞（ＡＴＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＤＭＥＭ（ＧＩＢＣＯ）（以下、培地）で培養した。Ａ３７５細胞を培地で4×10^4ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、６５μＬの培地を入れた９６穴細胞培養用マイクロプレート（ＣＯＲＮＩＮＧ）に２５μＬずつ添加して一晩培養した。翌日、ＤＭＳＯで１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈した被検物質をマイクロプレートに０．５μＬずつ添加した。被検物質非添加ウェルにはＤＭＳＯを０．５μＬずつ添加した。すべてのウェルに培地を１０μＬずつ添加して培地の液量を１００μＬとし、３７度、５％CO_2下で６日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し撹拌した。室温で１０分間静置後にプレートリーダーで発光量を計測した。IC_{50}値は次式で算出した。

IC_{50}（ｎＭ）＝ａｎｔｉｌｏｇ（（５０－ｄ）×（LOG_{10}ｂ－LOG_{10}

ａ）÷（ｄ－ｃ）＋ＬＯＧ$_{10}$ｂ）

ａ：被検物質の濃度ａ

ｂ：被検物質の濃度ｂ

ｃ：濃度ａの被検物質を添加したときの生細胞率

ｄ：濃度ｂの被検物質を添加したときの生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％をまたぐ濃度で、ａ＞ｂ

細胞生存率は次式で算出した。

細胞生存率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：被検物質添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：被検物質非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１０）

実施例（７５）の化合物、およびエキサテカンはA375細胞に対して０．１＜ＩＣ$_{50}$＜１（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。実施例（４２）の化合物は１＜ＩＣ$_{50}$＜１０（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。実施例（１）の化合物は１０＜ＩＣ$_{50}$＜１００（ｎＭ）の細胞傷害活性を示した。

[0512] （試験例１１）抗腫瘍試験（１）

マウス：５－６週齢の雌ＢＡＬＢ／ｃ　ヌードマウス（日本チャールス・リバー社）を実験使用前にＳＰＦ条件化で４－７日間馴化した。マウスには滅菌した固形飼料（ＦＲ－２，Ｆｕｎａｂａｓｈｉ　Ｆａｒｍｓ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ）を給餌し、滅菌した水道水（５－１５ｐｐｍ次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製）を与えた。

測定、計算式：全ての研究において、腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパー（ＣＤ－１５Ｃ，Ｍｉｔｕｔｏｙｏ　Ｃｏｒｐ．）で１週間に２回測定し、腫瘍体積（ｍｍ^3）を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積（ｍｍ^3）＝１／２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

抗体－薬物コンジュゲートは全て生理食塩水（大塚製薬工場）で希釈し、１０ｍＬ／ｋｇの液量を尾静脈内投与した。ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞をＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入した。生理食塩水に懸濁した８×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌ

ードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１１に無作為に群分けを実施した。Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体および抗体－薬物コンジュゲート（２）をＤａｙ１１、１８、２５に全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。

結果を図１７に示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、白三角線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。

抗体－薬物コンジュゲート（２）の投与によって腫瘍体積が著しく減少し、最終投与後は更なる腫瘍増殖が見られなかったことを示す。一方、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体投与では腫瘍の増殖が進行した。

また、抗体－薬物コンジュゲート（２）を投与されたマウスでは、体重減少などの特に目立った所見も無く、抗体－薬物コンジュゲート（２）は毒性的にも弱く、安全性も高いと考えられる。

〔0513〕（試験例１２）抗腫瘍試験（２）

ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞をＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入した。生理食塩水に懸濁した６×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１８に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（２）（０．１，０．３，１，３ｍｇ／ｋｇ）をＤａｙ１８、２５、３２に各用量ｑｗ×３のスケジュールで尾静脈内投与した。

結果を図１８に示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（２）０．１ｍｇ／ｋｇ投与時、線－Ｘ－は０．３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒三角線は１ｍｇ／ｋｇ投与時、白丸線は３ｍｇ／ｋｇ投与時の効果を示す。抗体－薬物コンジュゲート（２）は用量依存的に腫瘍の縮小効果を発揮した。

〔0514〕（試験例１３）抗腫瘍試験（３）

ヒト非小細胞肺癌株Ｃａｌｕ－６細胞をＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入した。生理食塩

水に懸濁した５×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（ＤａｙＯ）、Ｄａｙ１１に無作為に群分けを実施した。Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体および抗体－薬物コンジュゲート（２）をＤａｙ１１、１８、２５にｑｗ×３のスケジュールで全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。

結果を図１９に示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、白三角線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（２）の効果を示す。抗体－薬物コンジュゲート（２）の投与によって腫瘍体積が著しく減少し、最終投与後は更なる腫瘍増殖が見られなかった。一方、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体投与では腫瘍の増殖が進行した。

また、抗体－薬物コンジュゲート（２）を投与されたマウスでは、体重減少などの特に目立った所見も無く、抗体－薬物コンジュゲート（２）は毒性的にも弱く、安全性も高いと考えられる。

〔0515〕（試験例１４）抗腫瘍試験（４）

ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞をＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入した。生理食塩水に懸濁した８×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（ＤａｙＯ）、Ｄａｙ２１に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（１）、（１３）、（４１）、（５５）をＤａｙ２１に全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。

結果を図２０に示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（１）投与時、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１３）投与時、線－Ｘ－は抗体－薬物コンジュゲート（４１）投与時、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（５５）投与時の効果を示す。抗体－薬物コンジュゲート（１）、（１３）、（４１）、（５５）の投与によって腫瘍体積が著しく減少し、いずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した。

また、抗体－薬物コンジュゲート（１）、（１３）、（４１）、（５５）を投与されたマウスでは、体重減少などの特に目立った所見も無く、抗体－

OnCusp
Ex. 1002

薬物コンジュゲート（１）、（１３）、（４１）、（５５）は毒性的にも弱く、安全性も高いと考えられる。

[0516]（試験例１５）抗腫瘍試験（５）

ヒト非小細胞肺癌株Ｃａｌｕ－６細胞をＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入した。生理食塩水に懸濁した５×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１２に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（１３）、（４１）、（５５）をＤａｙ１２に全て１０　ｍｇ/ｋｇの用量で尾静脈内投与した。また比較対照としてＤＥ－３１０をＤａｙ１２に０．１　ｍｇ/ｋｇの用量で尾静脈内投与した。ここで、投与量の表記は抗体－薬物コンジュゲートでは抗体の投与量に基づく値であり、ＤＥ－３１０では含有薬物の投与量に基づく値であるので、抗体－薬物コンジュゲートとＤＥ－３１０の含有薬物量はおよそ１：１００であり、上記投与により同等量の含有薬剤を投与したことになる。

結果を図２１に示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、白丸線はDE-310、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１３）、線－Ｘ－は抗体－薬物コンジュゲート（４１）、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（５５）の効果を示す。抗体－薬物コンジュゲート（１３）、（４１）、（５５）の投与によって腫瘍体積が著しく減少した一方、ＤＥ－３１０の投与では腫瘍体積の減少は認められなかった。

また、抗体－薬物コンジュゲート（１３）、（４１）、（５５）を投与されたマウスでは、体重減少などの特に目立った所見も無く、これらの抗体－薬物コンジュゲートは毒性的にも弱く、安全性も高いと考えられる。

[0517]（試験例１６）抗腫瘍試験（６）

ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞をＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入した。生理食塩水に懸濁した１×１０^{7}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１１に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲー

ト（１７）、（１８）、（１９）、（５９）、（６０）、（６１）をＤａｙ１１、１８にｑｗ×２のスケジュールで全て３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。

結果を図２２に示す。図中の黒ひし形線は無処置の腫瘍、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１７）投与時、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１８）投与時、白丸線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）投与時、黒三角線は抗体－薬物コンジュゲート（５９）投与時、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（６０）投与時、線－Ｘ－は抗体－薬物コンジュゲート（６１）投与時の効果を示す。

抗体－薬物コンジュゲート（１７）、（１８）、（１９）、（５９）、（６０）、（６１）の投与によって腫瘍体積が著しく減少し、いずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した。

また、抗体－薬物コンジュゲート（１７）、（１８）、（１９）、（５９）、（６０）、（６１）を投与されたマウスでは、体重減少などの特に目立った所見も無く、これらの抗体－薬物コンジュゲートは毒性的にも弱く、安全性も高いと考えられる。

配列表フリーテキスト

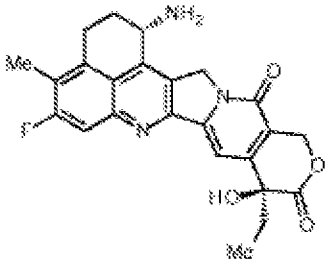
〔0518〕 配列番号１　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列
配列番号２　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント２のアミノ酸配列
配列番号３　－　ＭＯ抗体のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列
配列番号４　－　ＭＯ抗体のＣＤＲＨ２のアミノ酸配列
配列番号５　－　ＭＯ抗体のＣＤＲＨ３のアミノ酸配列
配列番号６　－　ＭＯ抗体のＣＤＲＬ１のアミノ酸配列
配列番号７　－　ＭＯ抗体のＣＤＲＬ２のアミノ酸配列
配列番号８　－　ＭＯ抗体のＣＤＲＬ３のアミノ酸配列
配列番号９　－　ＭＯ－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列
配列番号１０　－　ＭＯ－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列
配列番号１１　－　ＭＯ－Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号１２　－　Ｍ３０－Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列
配列番号１３　－　Ｍ３０－Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号１４　－　Ｍ３０－Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号１５　－　Ｍ３０－Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号１６　－　Ｍ３０－Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号１７　－　Ｍ３０－Ｌ５タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号１８　－　Ｍ３０－Ｌ６タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号１９　－　Ｍ３０－Ｌ７タイプ軽鎖のアミノ酸配列
配列番号２０　－　Ｍ３０抗体重鎖のアミノ酸配列
配列番号２１　－　Ｍ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列
配列番号２２　－　ＰＣＲプライマー１
配列番号２３　－　ＰＣＲプライマー２
配列番号２４　－　ＣＭＶ　ｐｒｏｍｏｔｅｒプライマー：プライマー３
配列番号２５　－　ＢＧＨ　ｒｅｖｅｒｓｅプライマー：プライマー４
配列番号２６　－　Ｂ７－Ｈ３バリアント１のヌクレオチド配列
配列番号２７　－　抗ＣＤ３０抗体重鎖のアミノ酸配列
配列番号２８　－　抗ＣＤ３０抗体軽鎖のアミノ酸配列
配列番号２９　－　抗ＣＤ３３抗体重鎖のアミノ酸配列
配列番号３０　－　抗ＣＤ３３抗体軽鎖のアミノ酸配列
配列番号３１　－　抗ＣＤ７０抗体重鎖のアミノ酸配列
配列番号３２　－　抗ＣＤ７０抗体軽鎖のアミノ酸配列

OnCusp
Ex. 1002

請求の範囲

［請求項1］　次式



で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体－薬物コンジュゲート。

（ここで、抗体はL^1の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、１位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、L^cの末端において結合し、

式中、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-を示し、

ここで、n^2は、２から８の整数を示し、n^3は、１から８の整数を示し、n^4は、１から８の整数を示し、

L^2は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-、-S-$(CH_2)n^6$-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、n^6は、１から６の整数を示し、

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^aは、-C(=O)-NH-、-NR^1-$(CH_2)n^7$-、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、-$(CH_2)n^8$-COOH、又は-$(CH_2)n^9$-OHを示すが、

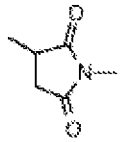
n^8は、整数の１から４を示し、n^9は、１から６の整数を示し、

L^9は、$-CR^2(-R^3)-$、$-O-$、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^a-NH_2$、$-(CH_2)n^b-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$を示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^aは、０から６の整数を示し、n^bは、整数の１から４を示し、n^cは、整数の１から４を示すが、n^aが０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

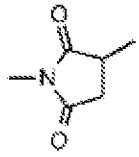
L^cは、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-Ly-3-diminiccuS)-は次式：



で示される構造であり、このものの３位でL^2と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

L^2が$-S-(CH_2)n^8-C(=O)-$のとき、L^1は$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-$(N-Ly-3-diminiccuS)-となる。）

〔請求項2〕 L^Pのペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるアミノ酸残基である請求項１に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項3] L^Pは、テトラペプチド残基を示し、

L^aは、-O-、又は単結合を示し、

L^bは、$-CR^2(-R^3)-$、-又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^a-NH_2$、$-(CH_2)n^b-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$を示し、n^bは、整数の１から４を示し、n^cは、整数の１から４を示すが、n^aが０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

L^cは、-C(=O)-を示す、請求項１又は２記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項4] L^Pは、GGFGのテトラペプチド残基を示し、

L^aは、-O-、又は単結合を示し、

L^bは、$-CR^2(-R^3)-$、-又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、水素原子を示し、

L^cは、-C(=O)-を示す、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項5] L^1が、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$又は$-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^3-C(=O)-$である請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項6] L^1が、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$である請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項7] L^1が、$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$又は$-C(=O)-(CH_2)n^4-C(=O)-$である請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項8] n^2が、２から５の整数であって、L^2が、単結合である請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項9] n^2が、２から５の整数であって、L^2が、$-NH-(CH_2CH_2O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$であり、$n^5$が、２又は４である請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項10] 次式：-NH-(CH2)n1-La-Lb-Lc-が、４から７原子の鎖長を有する部分構造である請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項11] 次式：-NH-(CH2)n1-La-Lb-Lc-が、５又は６原子の鎖長を有する部分構造である請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項12] 次式：-NH-(CH2)n1-La-Lb-Lc-が、

-NH-(CH2)3-C(=O)-、

-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-、又は

-NH-(CH2)2-O-CH2-C(=O)-

である請求項１～１１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項13] 前記リンカーの構造が、次の群から選ばれる１種の構造である請求項１～１２のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH2CH2-C(=O)-NH-CH2CH2O-CH2CH2O-CH2CH2-C(=O)

OnCusp
Ex. 1002

-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

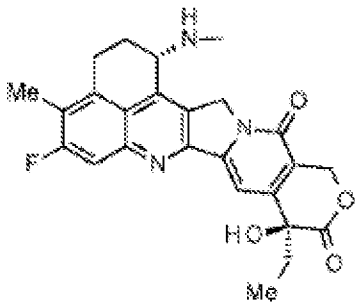
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-Ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

（ここで、-(NH-DX)は次式：



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示し、

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のペプチド残基を示す。）

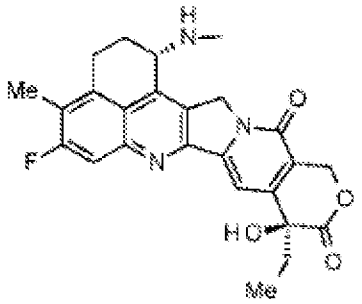
［請求項14］ 前記リンカーの構造が、次の群から選ばれる１種の構造である請求項１～６及び８～１１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

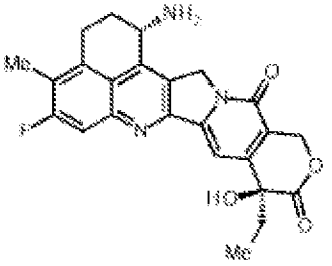
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

（ここで、-(NH-DX)は次式：



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。）

［請求項15］ 次式



で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^p-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体－薬物コンジュゲート。

（ここで、抗体はL^1の末端において結合し、抗腫瘍性化合物はL^cの末端において結合し、

式中、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-を示し、抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して抗体に結合し、

ここで、n^2は、２から８の整数を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)$-又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、

L^Pは、GGFGのテトラペプチド残基を示し、

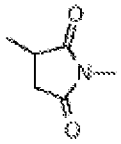
L^aは、-O-又は単結合を示し、

L^bは、$-CR^2(-R^3)$-又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は水素原子を示し、

L^cは-C(=O)-を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。）

[請求項16] n^2が２であり、L^2が-NH-$(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)$-であって、$n^5$が２であり、$n^1$が３であり、$L^a$および$L^b$がいずれも単結合であるか、

n^2が５であり、L^2が単結合であり、n^1が１であり、L^aが-O-であり、L^bが$-CR^2(-R^3)$-であるか、または

n^2が５であり、L^2が単結合であり、n^1が２であり、L^aが-O-であり、L^bが$-CR^2(-R^3)$-である、請求項１５に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項17] n^2が、２から５の整数であって、L^2が、単結合である請求項１５又は１６に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項18] n^2が、２から５の整数であって、L^2が、-NH-$(CH_2CH_2O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)$-であり、$n^5$が、２又は４である請求項１５又は１６に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項19] 次式：-NH-$(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$が、

-NH-$(CH_2)_5$-C(=O)-、

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、又は

-NH-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(=O)-

である請求項１５～１８のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔請求項20〕 前記リンカーの構造が、次の群から選ばれる１種の構造である請求項１５～１９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

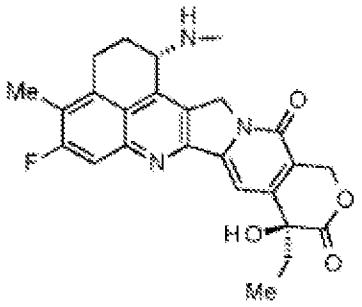
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

OnCusp
Ex. 1002

（ここで、-(NH-DX)は次式：



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。）

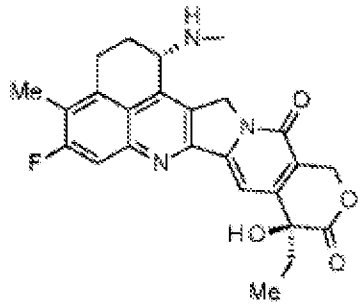
［請求項21］ 前記リンカーの構造が、次の群から選ばれる１種の構造である請求項１５～１９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

（ここで、-(NH-DX)は次式：



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。）

［請求項22］ 選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である請求項１から２１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項23] 選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である請求項１から２１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項24] 選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である請求項１から２１のいずれか一に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項25] 抗体が、標的細胞を認識できる特性、標的細胞に結合できる特性、標的細胞に内在化できる特性、標的細胞を傷害する特性の一又はそれ以上の特性を備えた抗体である請求項１～２４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項26] 抗体－薬物コンジュゲートが標的とする細胞が腫瘍細胞である請求項１～２４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項27] 抗体が、抗Ａ３３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣａｎＡｇ抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ７０抗体、抗ＣＥＡ抗体、抗Ｃｒｉｐｔｏ抗体、抗ＥｐｈＡ２抗体、抗Ｇ２５０抗体、抗ＭＵＣ１抗体、抗ＧＰＮＭＢ抗体、抗Ｉｎｔｅｇｒｉｎ抗体、抗体ＰＳＭＡ抗体、抗Ｔｅｎａｓｃｉｎ－Ｃ抗体、抗ＳＬＣ４４Ａ４抗体、又は抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体である請求項１～２４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項28] 抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３３抗体、又は抗ＣＤ７０抗体である請求項１～２４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項29] 抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体である請求項１～２４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項30] 請求項１～２９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート又はその塩を含有する医薬。

[請求項31] 請求項１～２９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート又

はその塩を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

[請求項32] 肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、又は食道癌に適用するための請求項３１に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

[請求項33] 請求項１～２９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート又はその塩を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

[請求項34] 請求項１～２９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート又はその塩を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

[請求項35] 次式で示される薬物－リンカー中間体化合物。

$Q-(CH_2)n^a-C(=O)-L^{2a}-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

（式中、Qは、(maleimid-N-yl)-、HS-、$X-CH_2-C(=O)-NH-$、又は(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-を示し、

Xは、臭素原子又はヨウ素原子を示し、

n^aは、整数の２から８を示し、

L^{2a}は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^c-CH_2-CH_2-C(=O)-$、又は単結合を示し、

ここで、n^cは、１から６の整数を示し、

L^Pは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^aは、$-C(=O)-NH-$、$-NR^1-(CH_2)n^7-$、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-COOH$、又は$-(CH_2)n^9-OH$を示すが、

n^8は、整数の１から４を示し、n^9は、１から６の整数を示し、

L^bは、$-CR^2(-R^3)-$、-O-、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

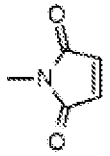
ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^a-NH_2$、$-(CH_2)n^b-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$を示し

OnCusp
Ex. 1002

、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^8は、０から６の整数を示し、n^9は、整数の１から４を示し、n^{10}は、整数の１から４を示すが、n^8が０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

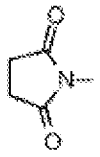
L^6は、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

(maleimid-N-yl)-は、次式



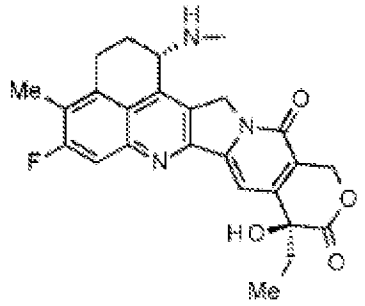
で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)は、次式



で示される窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。）

［請求項36］　L^6が$-C(=O)-$である請求項３５に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

［請求項37］　L^Pが、４個のアミノ酸から構成されたペプチド残基である請求項３５又は３６に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項38] L^Pが、-GGFG-である請求項３５～３７のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項39] 次式：-NH-$(CH_2)n^3$-L^a-L^b-が、

-NH-CH_2CH_2-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である、請求項３５～３８のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項40] 次式：-NH-$(CH_2)n^3$-L^a-L^b-が、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-$(CH_2)_2$-O-CH_2-である、請求項３５～３８のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項41] n^Qが、整数の２から６である、請求項３５～４０のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項42] Qが、(maleimid-N-yl)-であり、

n^Qが、整数の２から５であり、

L^{2a}が単結合である、請求項３９に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項43] Qが、(maleimid-N-yl)-であり、

n^Qが、整数の２から５であり、

L^{2a}が単結合である、請求項４０に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項44] Qが、(maleimid-N-yl)-であり、

n^Qが、整数の２から５であり、

L^{2a}が-NH-$(CH_2$-CH_2-O$)n^5$-CH_2-CH_2-C(=O)-であり、

n^5が、整数の２から４であり、

-NH-$(CH_2)n^3$-L^8-L^9-が、

-NH-CH_2CH_2-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である、請求項３５～３８のいずれか一項に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項45] n^5が、整数の２又は４であり、

-NH-$(CH_2)n^3$-L^8-L^9-が、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、

-NH-CH_2-O-CH_2-、又は

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である請求項４４に記載の薬物－リンカー中間体化合物。

[請求項46] 次の化合物：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX

OnCusp
Ex. 1002

)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

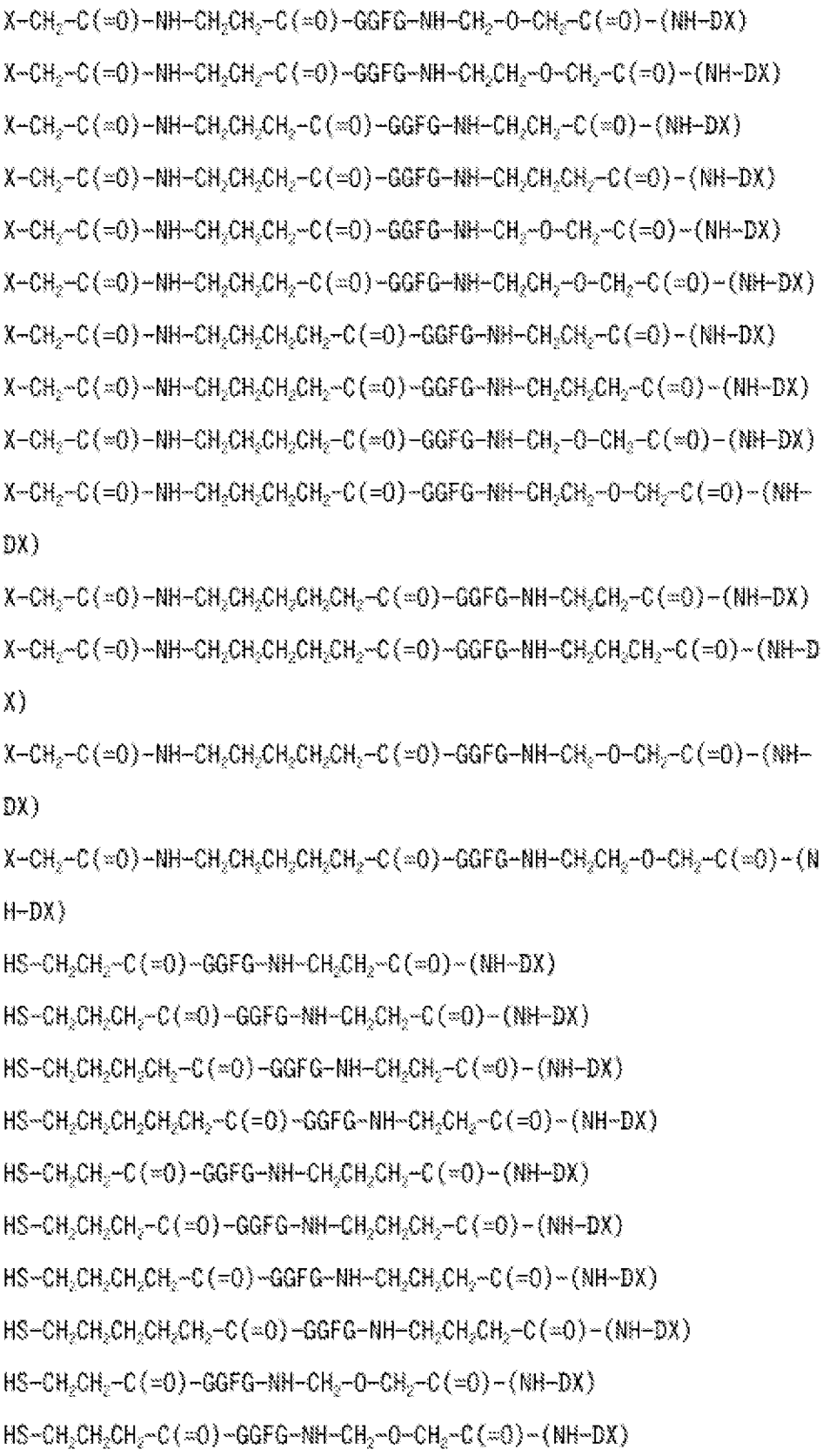
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)


X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
X-CH2-C(=O)-NH-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2CH2CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)
HS-CH2CH2CH2-C(=O)-GGFG-NH-CH2-O-CH2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

HS-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

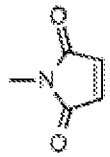
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、又は

OnCusp
Ex. 1002

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2
CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

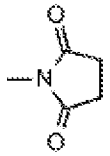
（ここで，(maleimid-N-yl)-は，次式



で示される，窒素原子が結合部位である基であり，

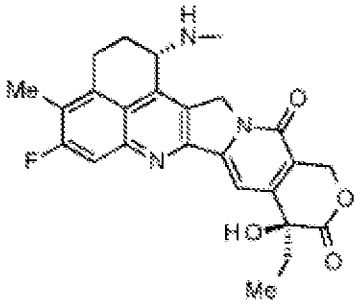
Xはハロゲン原子を示し，

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は，次式



で示される，窒素原子が結合部位である基であり，

-(NH-DX)は，次式



で示される，１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である）。

〔請求項47〕 次の化合物：

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX
)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

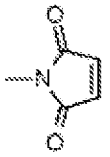
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、又は

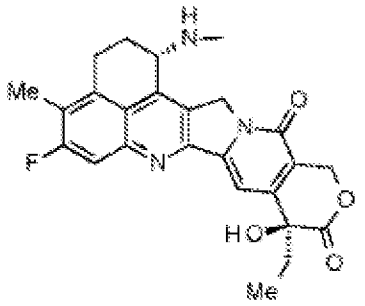
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

（ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である）。

[請求項48] 次の化合物：

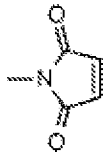
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)又は

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

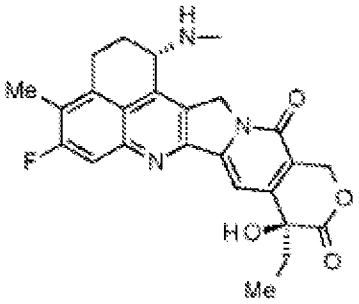
（ここで、(maleimid-N-yl)-は、次式

OnCusp
Ex. 1002



で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である）。

[請求項49] リンカーを介して薬物と抗体とが結合された抗体－薬物コンジュゲートを得るための次式で示されるリンカー。

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$

（ここで、L^1は抗体への結合部位であり、L^cは抗腫瘍性化合物への結合部位であり、

式中、

n^1は、０から６の整数を示し、

L^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、$-CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2)n^3$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^4$-C(=O)-を示し、

ここで、n^2は、２から８の整数を示し、n^3は、１から８の整数を示し、n^4は、１から８の整数を示し、

L^2は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^5-CH_2-CH_2-C(=O)-$、$-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$、又は単結合を示し、

ここで、n^5は、１から６の整数を示し、n^6は、１から６の整数を

示し、

L^pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^aは、-C(=O)-NH-、$-NR^1-(CH_2)n^7-$、-O-、又は単結合を示し、

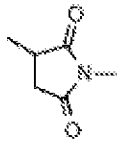
ここで、n^7は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^8-COOH$、又は$-(CH_2)n^8-OH$を示すが、n^8は、整数の１から４を示し、n^9は、１から６の整数を示し、

L^bは、$-CR^2(-R^3)-$、-O-、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

ここで、R^2及びR^3は、各々独立に、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^a-NH_2$、$-(CH_2)n^b-COOH$、又は$-(CH_2)n^c-OH$を示し、R^4は、水素原子又は炭素数１から６のアルキル基を示し、n^aは、０から６の整数を示し、n^bは、整数の１から４を示し、n^cは、整数の１から４を示すが、n^aが０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

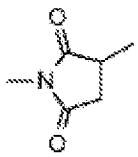
L^cは、$-CH_2-$又は-C(=O)-を示し、

-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：



で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：



で示される構造であり、このものの３位でL^2と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

L^aが$-S-(CH_2)n^6-C(=O)-$のとき、L^1は$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-$(N-ly

-3-diminicous)-となる。)

[図1]

Ｂ７－Ｈ３ベクター１のアミノ酸配列（配列番号１）

ＭＬＲＲＲＧＳＰＧＭＧＶＨＶＧＡＡＬＧＡＬＷＦＣＬＴＧＡＬＥＶＱＶＰＥＤＰＶＶＡＬＶＧＴＤ
ＡＴＬＣＣＳＦＳＰＥＰＧＦＳＬＡＱＬＮＬＩＷＱＬＴＤＴＫＱＬＶＨＳＦＡＥＧＱＤＱＧＳＡＹＡ
ＮＲＴＡＬＦＰＤＬＬＡＱＧＮＡＳＬＲＬＱＲＶＲＶＡＤＥＧＳＦＴＣＦＶＳＩＲＤＦＧＳＡＡＶＳ
ＬＱＶＡＡＰＹＳＫＰＳＭＴＬＥＰＮＫＤＬＲＰＧＤＴＶＴＩＴＣＳＳＹＱＧＹＰＥＡＥＶＦＷＱＤ
ＧＱＧＶＰＬＴＧＮＶＴＴＳＱＭＡＮＥＱＧＬＦＤＶＨＳＩＬＲＶＶＬＧＡＮＧＴＹＳＣＬＶＲＮＰ
ＶＬＱＱＤＡＨＳＳＶＴＩＴＰＱＲＳＰＴＧＡＶＥＶＱＶＰＥＤＰＶＶＡＬＶＧＴＤＡＴＬＲＣＳＦ
ＳＰＥＰＧＦＳＬＡＱＬＮＬＩＷＱＬＴＤＴＫＱＬＶＨＳＦＴＥＧＲＤＱＧＳＡＹＡＮＲＴＡＬＦＰ
ＤＬＬＡＱＧＮＡＳＬＲＬＱＲＶＲＶＡＤＥＧＳＦＴＣＦＶＳＩＲＤＦＧＳＡＡＶＳＬＱＶＡＡＰＹ
ＳＫＰＳＭＴＬＥＰＮＫＤＬＲＰＧＤＴＶＴＩＴＣＳＳＹＲＧＹＰＥＡＥＶＦＷＱＤＧＱＧＶＰＬＴ
ＧＮＶＴＴＳＱＭＡＮＥＱＧＬＦＤＶＨＳＶＬＲＶＶＬＧＡＮＧＴＹＳＣＬＶＲＮＰＶＬＱＱＤＡＨ
ＧＳＶＴＩＴＧＱＰＭＴＦＰＰＥＡＬＷＶＴＶＧＬＳＶＣＬＩＡＬＬＶＡＬＡＦＶＣＷＲＫＩＫＱＳ
ＣＥＥＥＮＡＧＡＥＤＱＤＧＥＧＥＧＳＫＴＡＬＱＰＬＫＨＳＤＳＫＥＤＤＧＱＥＩＡ

[図2]

Ｂ７－Ｈ３ベクター２のアミノ酸配列（配列番号２）

ＭＬＲＲＲＧＳＰＧＭＧＶＨＶＧＡＡＬＧＡＬＷＦＣＬＴＧＡＬＥＶＱＶＰＥＤＰＶＶＡＬＶＧＴＤ
ＡＴＬＣＣＳＦＳＰＥＰＧＦＳＬＡＱＬＮＬＩＷＱＬＴＤＴＫＱＬＶＨＳＦＡＥＧＱＤＱＧＳＡＹＡ
ＮＲＴＡＬＦＰＤＬＬＡＱＧＮＡＳＬＲＬＱＲＶＲＶＡＤＥＧＳＦＴＣＦＶＳＩＲＤＦＧＳＡＡＶＳ
ＬＱＶＡＡＰＹＳＫＰＳＭＴＬＥＰＮＫＤＬＲＰＧＤＴＶＴＩＴＣＳＳＹＲＧＹＰＥＡＥＶＦＷＱＤ
ＧＱＧＶＰＬＴＧＮＶＴＴＳＱＭＡＮＥＱＧＬＦＤＶＨＳＶＬＲＶＶＬＧＡＮＧＴＹＳＣＬＶＲＮＰ
ＶＬＱＱＤＡＨＧＳＶＴＩＴＧＱＰＭＴＦＰＰＥＡＬＷＶＴＶＧＬＳＶＣＬＩＡＬＬＶＡＬＡＦＶＣ
ＷＲＫＩＫＱＳＣＥＥＥＮＡＧＡＥＤＱＤＧＥＧＥＧＳＫＴＡＬＱＰＬＫＨＳＤＳＫＥＤＤＧＱＥＩ
Ａ

[図3]

Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号９）

ＭＫＨＬＷＦＦＬＬＬＶＡＡＰＲＷＶＬＳＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧ
ＹＴＦＴＮＹＶＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＹＩＮＰＹＮＤＤＶＫＹＮＥＫＦＫＧＲＶＴＩＴ
ＡＤＥＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＷＧＹＹＧＳＰＬＹＹＦＤＹＷＧＱＧＴ
ＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮ
ＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫ
ＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰ
ＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩ
ＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷ
ＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳ
ＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

[図4]

M30－H2タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号10）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[図5]

M30－H3タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号11）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[図6]

M30－H4タイプ重鎖のアミノ酸配列（配列番号12）

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG
YTFTNYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[図7]

M30-L1タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号13）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図8]

M30-L2タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号14）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図9]

M30-L3タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号15）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPRLWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図10]

M30-L4タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号16）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図11]

M30－LSタイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号17）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGQIVLSQSPATLSLSPGERATLTCRA
SSRLIYMHWYQQKPGSAPKPWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTSY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図12]

M30－LGタイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号18）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図13]

M30－L7タイプ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号19）

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA
SSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDY
TLTISRLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[図14]

M30抗体重鎖のアミノ酸配列（配列番号20）

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG
YTFTNYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQT
SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYGSPLYYFDYWGQGT
TLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL
TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV
AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK
IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT
HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI
SKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[図15]

M30抗体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号21）

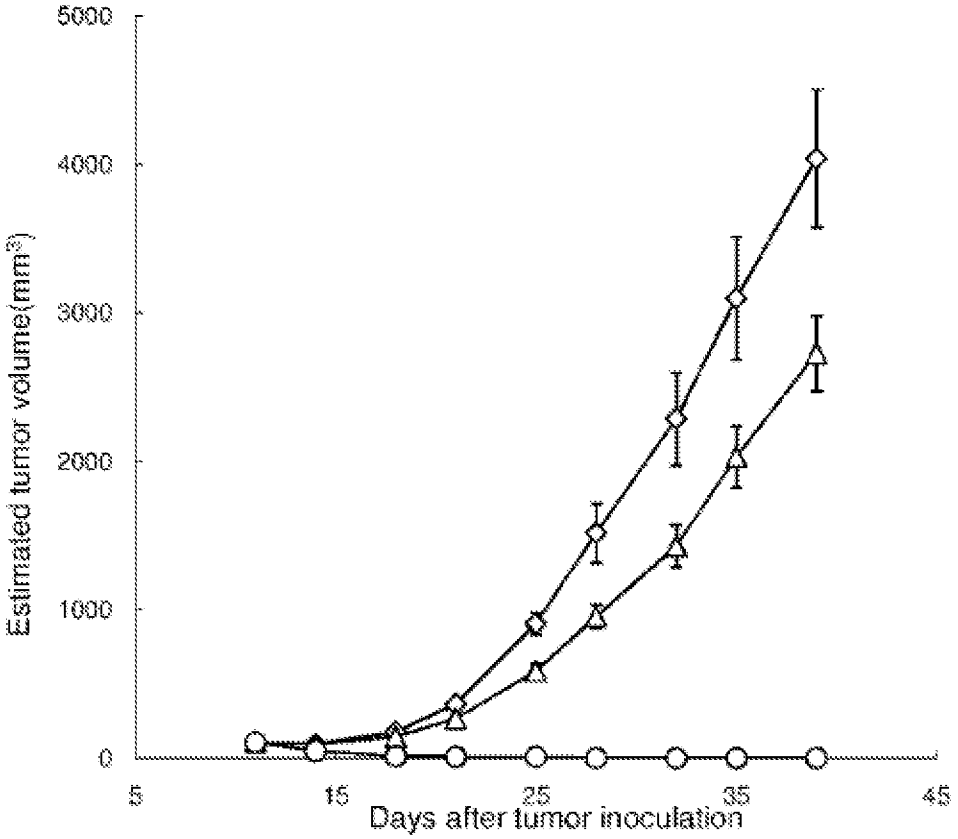
MDFLVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC
RASSRLIYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGT
SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGTGTKLELKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGV
LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSP
IVKSFNRNEC

[図16]

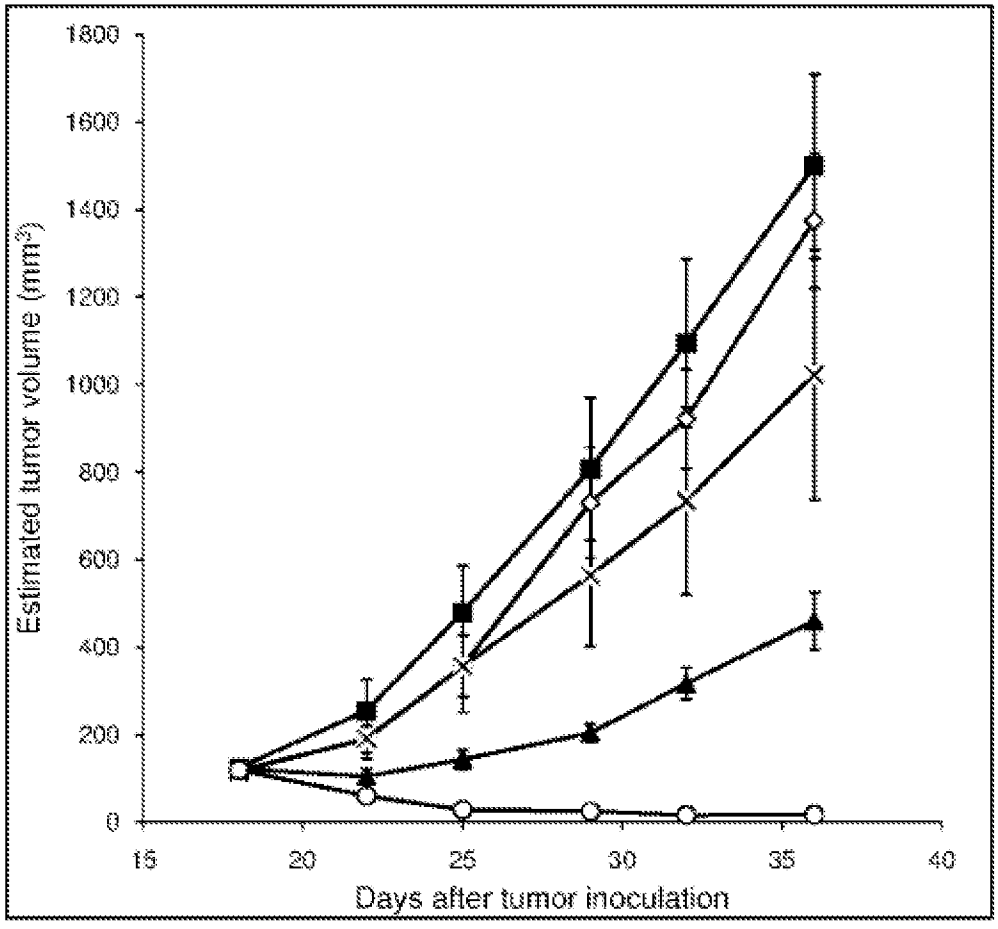
Ｂ７－Ｈ３バリアント１のヌクレオチド配列（配列番号２５）

atgcigcgtcggcggggcagcccfggcafgggtgtgcatgtgggi
gcagccctgggagcactggttctgccfcacaggagccctggag
gicccaggiccctgaagaccccagtggigggcactggigggcaccgat
gccacccctgtgctgcfccttctccccctgagccfggcctcagcctg
gcacagctcaacctcafctggcaggtgacaggatacccaaacagctg
gtgcacagcttfgcigaggccaggaccaggggcagcgcctatgcc
aaccgcacggcccfctfccccggacctgcigggcacagggggcaacgca
tcccfgaggcfgcagcgcgtgcgtggcggacgagggcagcttc
acctgcttcgtgagcatccgggactttgggcagcgcfgccgtcagc
ctgcaggtggccgctcccfactcgaagcccagcatgaccctggag
cccaacaaggaccfgcggccaggggacacggtgaccafcacgtgc
tccagcfaccaggccfaccctgaggctgaggtgttcfggcaggai
ggggcaggtgtgcccctgacfggcaacgfgaccacgfcgccaggat
gccaacgaggcaggcttgttgatgtgcacagcatcctgcgggtg
gtgcfggtgcaatggcacctacagcfgccfggtacgcaaccccc
gtgcfgcagcaggatgccgcacgcctatgccaaccgcacggccctcficcg
gaccfgctggcacaaggccatgcatcccctgaggctgcaggcgtg
cgtgfggccggacgaggcagcfcaccfgcfcgtgagcatccgg
gatficggcagcgcfgccgfcaggcctgcaggtggccgctcccfcc
fcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggacctgcggcca
ggggacaccggtgaccatcacgtgcfccagctaccggggctaccct
gaggctgaggtgttcfggcaggatgggcfgtgcccctgact
ggcaacgtgaccacgtcgccagtcgccaacgagcagggcfigtti
gatgfgcacaggcgfcctgcgggtggtgcfgggtgcgaatggcacc
tccagctgccfggfgcgccaccccgtgcfccagcaggatgccgcac
ggcfctgtccccatcacagggcagccfatgacatccccccagga
gcccfgtgggtgaccgtgggggcfgfctgfctgfctcattgcactg
ctggfggccctggcfffcgtgfgctggaggaaaggatcaaacagagc
tgtgaggaggaggaaigcaggagcfgaggaccaggatgggggagga
gaaggcfccaagacagccccfgcagcctcfgaaaacactctgacagc
aaagaagatgatggaccaggaaatagccfgagcggccgccactgtg
ctggatatcfgcaggatfccaccacactggacffagtggatccgga
cicggtaccaagcttaagtttaaacgcfgatcaggccfcgacfgt
gccftctagttgccagccatctgfttgtttgcccctccccccgtgcc
ficcttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctfcctaata
aaatgaggaaattgc

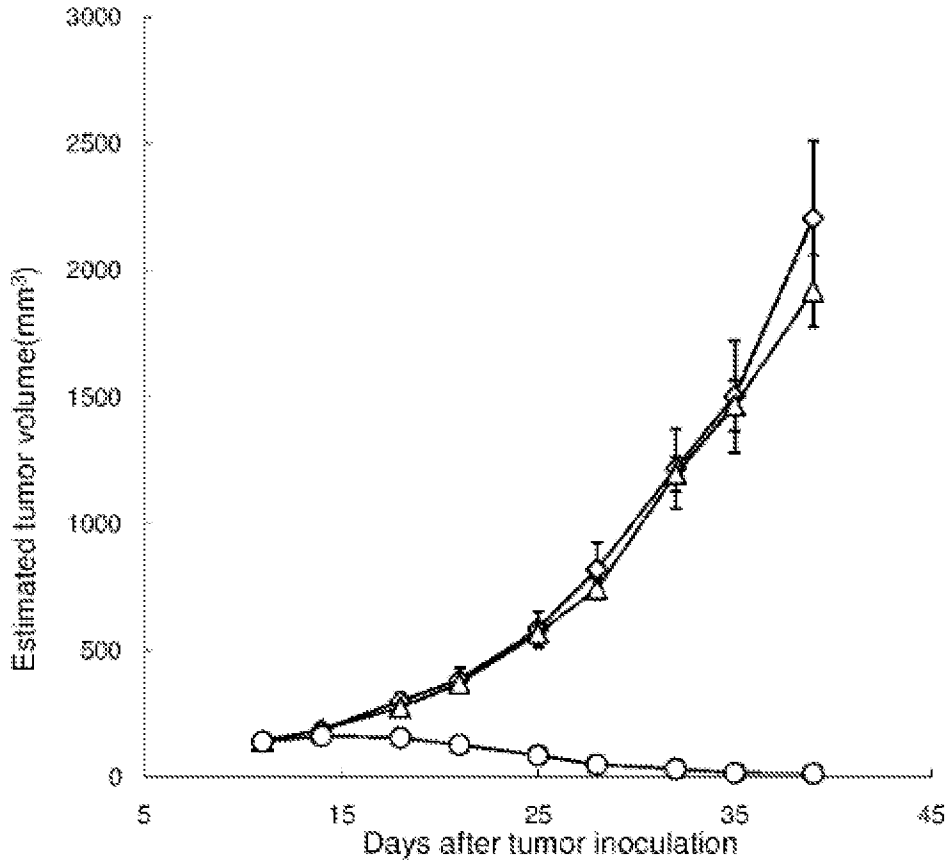
[図17]


5000
4000
3000
2000
1000
0
Estimated tumor volume(mm3)
5
15
25
35
45
Days after tumor inoculation

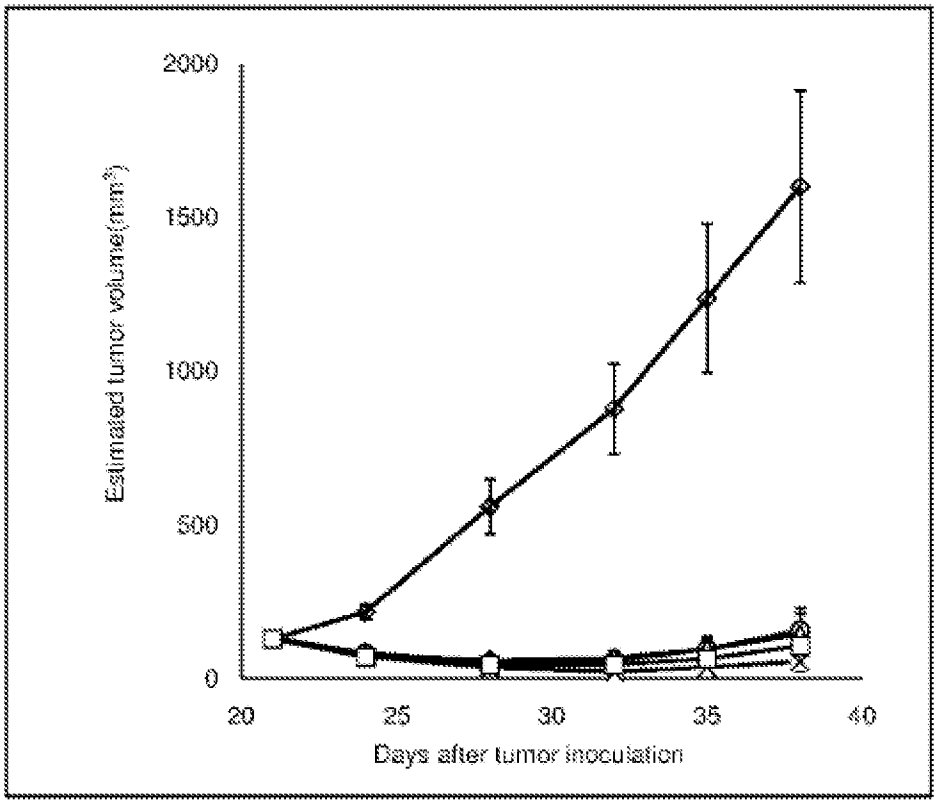
[図18]


1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Estimated tumor volume (mm3)
15
20
25
30
35
40
Days after tumor inoculation

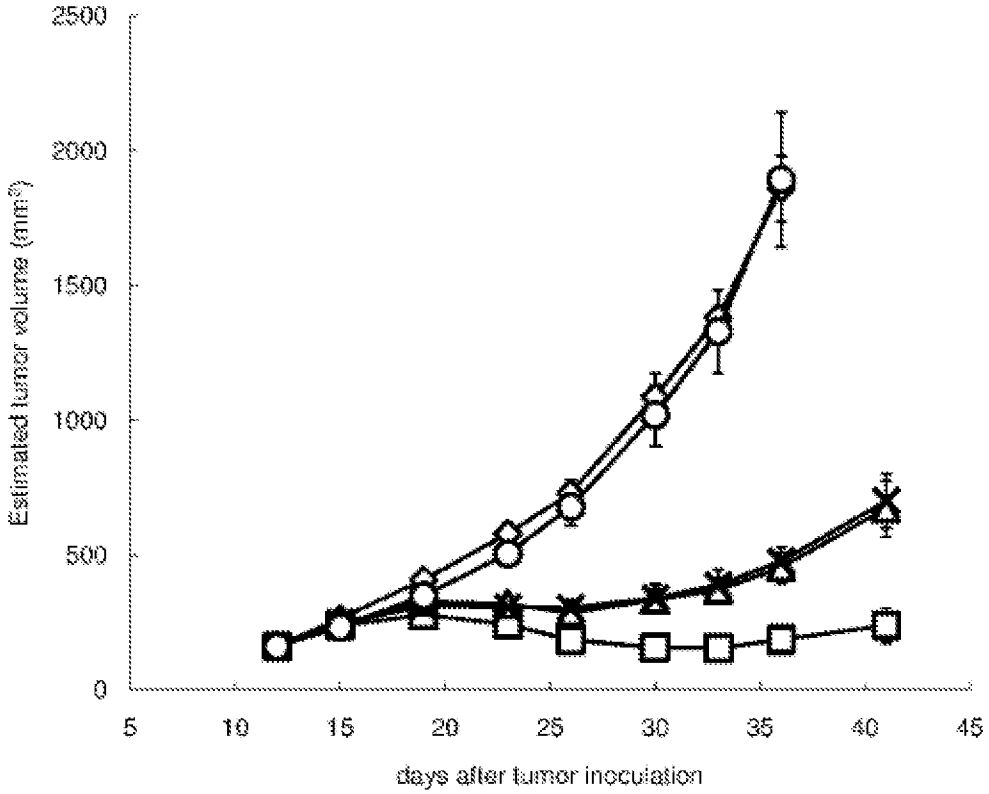
[図19]


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume(mm3)
5
15
25
35
45
Days after tumor inoculation

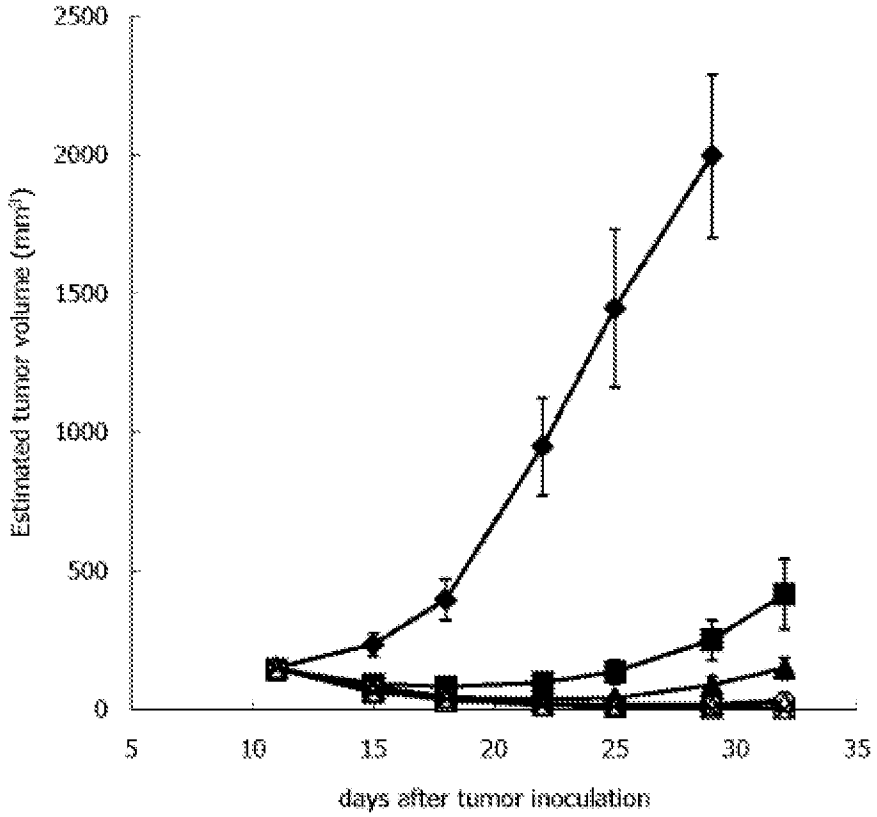
[図20]


2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume(mm3)
20
25
30
35
40
Days after tumor inoculation

[図21]


2500
2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume (mm3)
5
10
15
20
25
30
35
40
45
days after tumor inoculation

[図22]


2500
2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume (mm3)
5
10
15
20
25
30
35
days after tumor inoculation

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)n, A61K31/48(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61K31/4745, A61K31/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY(STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2009-538629 A (Genentech, Inc.), 12 November 2009 (12.11.2009), entire text & US 2008/0050310 A1 & EP 2032606 A2 & WO 2007/140371 A2 & CN 101490087 A	49 1-33,35-48
X Y	JP 2008-521828 A (Seattle Genetics, Inc.), 26 June 2008 (26.06.2008), entire text & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A2 & WO 2006/065533 A2	49 1-33,35-48
X Y	JP 2005-511627 A (Seattle Genetics, Inc.), 28 April 2005 (28.04.2005), entire text & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A2 & WO 2003/043583 A2	49 1-33,35-48

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 December, 2013 (04.12.13)	17 December, 2013 (17.12.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/000734 A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 January 2002 (03.01.2002), entire text & US 2003/0166513 A1 & EP 1298145 A1 & CN 1449412 A	1-33,35-48
Y	JP 11-092405 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 April 1999 (06.04.1999), entire text (Family: none)	1-33,35-48
Y	JP 10-095802 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 14 April 1998 (14.04.1998), entire text & US 5892043 A & EP 781781 A2 & CN 1158334 A	1-33,35-48
A	DOSIO, F. et al., "Antibody-targeted leucinostatin A.", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 1994.11, Vol.32, No.1, P.37-44	49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006069

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [x] Claims Nos.: 34
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 34 pertains to a therapeutic method for a human being and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and (PCT Rule 39.1(iv)).

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

OnCusp
Ex. 1002

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６０６９

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)n, A61K31/48(2006.01)n

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61K31/4745, A61K31/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY(STN), PubMed

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 2009-538629 A（ジェネンテック・インコーポレーテッド）2009.11.12, 全文 & US 2008/0050310 A1 & EP 2032606 A2 & WO 2007/140371 A2 & CN 101490087 A	49 1-33, 35-48
X Y	JP 2008-521828 A（シアトル　ジェネティックス，インコーポレイテッド）2008.06.26, 全文 & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A2 & WO 2006/065533 A2	49 1-33, 35-48

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０４．１２．２０１３	１７．１２．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	４１５５
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	野村　英雄 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００９年７月）

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP2013／006060

C（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 2005-511627 A（シアトル ジェネティクス，インコーポレーテッド）2005.04.28，全文 & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A2 & WO 2003/043583 A2	49 1-33，35-48
Y	WO 2002/000734 A1（第一製薬株式会社）2002.01.03，全文 & US 2003/0166513 A1 & EP 1298145 A1 & CN 1449412 A	1-33，35-48
Y	JP 11-092405 A（第一製薬株式会社）1999.04.06，全文 （ファミリーなし）	1-33，35-48
Y	JP 10-095802 A（田辺製薬株式会社）1998.04.14，全文 & US 5892043 A & EP 781781 A2 & CN 1158334 A	1-33，35-48
A	DOSIO, F. et al., "Antibody-targeted leucinostatin A.", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 1994.11, Vol.32, No.1, P.37-44	49

OnCusp
Ex. 1002

国際調査報告 | 国際出願番号 PCT/JP2013/006069

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☑ 請求項 34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項34はヒトに対する治療方法に関するものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及び［PCT規則39.1(iv)］の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 February 2016 (18.02.2016)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2016/024195 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2015/056032

(22) International Filing Date:
7 August 2015 (07.08.2015)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/036,382 12 August 2014 (12.08.2014) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(71) Applicant: **DÜRR, Clemens** [DE/CH]; Novartis Pharma AG, Postfach, 4002 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(71) Applicants *(for US only)*: **BIALUCHA, Carl Ulf** [DE/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **COLLINS, Scott** [GB/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **HU, Tianen** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **JANATPOUR, Mary Jo** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 5300 Chiron Way, Emeryville, California 94608 (US). **MEYER, Matthew John** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02319 (US).

(74) Agent: **NOVARTIS AG**; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2016/024195 A1

(54) Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

(57) Abstract: The present invention relates to anti-CDH6 antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present disclosure is directed to anti-CDH6 antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Cadherins are a family of cell adhesion molecules involved in cell-cell contact. There are more than 30 cadherin molecules in the family which consists of subclasses with individual binding specificities. There are well studied classic cadherins such as epithelial (E) cadherin, neural (N) cadherin and placental (P) cadherin which play key roles in the development and maintenance of tissues such as the epithelium. The cadherin family has also been classified by their amino acid similarities, which separate the cadherins into two groups, type I and type II. Then there are tissue specific cadherins such as cadherin-6 (CDH6).

[0003] CDH6 was first cloned and characterized in 1995 (Shimoyama et al., Cancer Res. 1995; 55 (10)2206-2211). The CDH6 cDNA isolated by Shimoyama was 4315 nucleotides and coded for a cadherin protein of 790 amino acids and exhibited 97% homology with rat K-cadherin (Shimoyama, *supra*). CDH6 is a type II cadherin with five extracellular cadherin repeats, a transmembrane domain and a cytoplasmic domain. In probing for normal tissue expression, CDH6 was detected in brain, cerebellum and kidney, with weaker expression in the lung, pancreas and gastric mucosa. In the nervous system, CDH6 was found to demarcate the auditory and somatosensory systems (Inoue et al., Mol. Cell Neuro. 2008; (39) 95-104). It was demonstrated that CDH6 is expressed by a subset of retinal ganglion cells (RGCs) in the eye responsible for such vision qualities as brightness, direction of motion or edges (Osterhout et al., Neuron 2011; 71(4)632-639). In the CDH6 knockout mouse, the absence of CDH6 cause loss of axon targeting. The CDH6 mutant axons elongated properly and were appropriately guided to their targets, but then grew through and past their connections (Osterhout, *supra*). In another study, CDH6 knockout mice demonstrated defects in vocalization (Nakagawa eta la., PLOS 2012; 7(11) e49233).

[0004] Turning to its expression in cancer, the CDH6 cDNA was cloned from a hepatocellular carcinoma cell line, which was an early indication it may be involved in this type of cancer (Shimoyama, *supra*). The early work found CDH6 expression in several hepatoma lines, but

no expression in normal liver. In later work, a group analyzed 216 patients with renal cell carcinoma and found that CDH6 expression correlated with this type of cancer (Paul et al., J Urology 2004 (171): 97-101). Shimazui found that renal cell carcinoma patients who expressed CDH6 and lacked E-cadherin expression had a poor prognosis (Shimazui et al., Clin. Cancer Res. 1998 (4): 2419-2424). It was also discovered that CDH6 was a TGF-B target and plays a role in thyroid cancer (Sancisi et al., PLoS One 2013; 8(9): e75489). Lastly, CDH6 was shown to be a biomarker for ovarian cancer (Kobel et al., PLoS One 2008 5(12): e232).

[0005] Antibody drug conjugates ("ADCs") have been used for the local delivery of cytotoxic agents in the treatment of cancer (see e.g., Lambert, Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549, 2005). ADCs allow targeted delivery of the drug moiety where maximum efficacy with minimal toxicity may be achieved. As more ADCs show promising clinical results, there is an increased need to develop new therapeutics for cancer therapy.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] An antibody drug conjugate of the formula:

$$Ab-(L-(D)_m)_n$$

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein

Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to an epitope of human CDH6;

L is a linker;

D is a drug moiety;

m is an integer from 1 to 8; and

n is an integer from 1 to 10.

[0007] The antibody drug conjugate according of any of the preceding embodiments, wherein said n is 3 or 4.

[0008] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof specifically binds the extracellular domain of CDH6 (SEQ ID NO:4).

[0009] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment specifically binds to an epitope of human CDH6 at SEQ ID NO:534.

[0010] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:224, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:225, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:226; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 227, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 228, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:229;

(ii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:210, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:211, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:212; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:213, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 214, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:215;

(iii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:266, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:267, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:268; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 269, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:270, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 271;

(iv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:308, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:309, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:310; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:311, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:312, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:313;

(v) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:14, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:15, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:16; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:17, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:18, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:19;

(vi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:28, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:29, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:30; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:31, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:32, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:33;

(vii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:42, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:43, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:44; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:45, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:46, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:47;

(viii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:56, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:57, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:58; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:59, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:60, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:61;

(ix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:70, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:71, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:72; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:73, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:74, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:75;

(x) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:84, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:85, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:86; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:87, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 88, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 89;

(xi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:98, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:99, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:100; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:101, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:102, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:103;

(xii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:112, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:113, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:114; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:115, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:116, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:117;

(xiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:126, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:127, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:128; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:129, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:130, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:131;

(xiv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:140, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:141, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:142; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:143, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:144, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:145;

(xv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:154, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:155, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:156; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:157, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:158, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:159;

(xvi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:168, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:169, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:170; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:171, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:172, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:173;

(xvii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:182, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:183, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:184; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:185, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:186, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:187;

(xviii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:196, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:197, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:198; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:199, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:200, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:201;

(xix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:238, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:239, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:240; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:241, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:242, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:243;

(xx) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:252, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:253, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:254; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:255, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:256, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:257;

(xxi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:280, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:281, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:282; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:283, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:284, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:285;

(xxii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:294, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:295, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:296; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:297, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:298, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:299; or

(xxiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:322, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:323, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:324; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:325, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:326, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:327.

[0011] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-CDH6 antibody in Table 5 or 6.

[0012] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, in which one or two amino acids within a CDR have been modified, deleted or substituted.

[0013] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 230, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:231;

(ii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 216, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:217;

(iii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 272, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:273;

(iv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:314, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:315;

(v) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:20, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:21;

(vi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 34, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:35;

(vii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:48, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:49;

(viii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:62, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:63;

(ix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:76, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:77;

(x) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:90, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:91;

(xi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:104, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:105;

(xii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 118, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:119;

(xiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 132, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:133;

(xiv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 146, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:147;

(xv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:160, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:161;

(xvi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 174, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:175;

(xvii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 188, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:189;

(xviii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 202, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:203;

(xix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 244, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:245;

(xx) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:258, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:259;

(xxi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:286, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:287;

(xxii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:300, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:301; or

(xxiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:328, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:329.

[0014] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 234, and a light chain that comprises SEQ ID NO:235;

(ii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 220, and a light chain that comprises SEQ ID NO:221;

(iii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 276, and a light chain that comprises SEQ ID NO:277;

(iv) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:318, and a light chain that comprises SEQ ID NO:319;

(v) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:24, and a light chain that comprises SEQ ID NO:25;

(vi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 38, and a light chain that comprises SEQ ID NO:39;

(vii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:52, and a light chain that comprises SEQ ID NO:53;

(viii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:66, and a light chain that comprises SEQ ID NO:67;

(ix) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:80, and a light chain that comprises SEQ ID NO:81;

(x) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:94, and a light chain that comprises SEQ ID NO:95;

(xi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:108, and a light chain that comprises SEQ ID NO:109;

(xii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 122, and a light chain that comprises SEQ ID NO:123;

(xiii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:136, and a light chain that comprises SEQ ID NO:137;

(xiv) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:150, and a light chain that comprises SEQ ID NO:151;

(xv) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:164, and a light chain that comprises SEQ ID NO:165;

(xvi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:178, and a light chain that comprises SEQ ID NO:179;

(xvii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:192, and a light chain that comprises SEQ ID NO:193;

(xviii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:206, and a light chain that comprises SEQ ID NO:207;

(xix) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:248, and a light chain that comprises SEQ ID NO:249;

(xx) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:262, and a light chain that comprises SEQ ID NO:263;

(xxi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:290, and a light chain that comprises SEQ ID NO:291;

(xxii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:304, and a light chain that comprises SEQ ID NO:305; or

(xxiii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:332, and a light chain that comprises SEQ ID NO:333.

[0015] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments that retains at least 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 or 99% identity over either the variable light or variable heavy region.

[0016] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human engineered antibody, a human antibody, a single chain antibody (scFv) or an antibody fragment.

[0017] The antibody drug conjugate according to any of the preceding embodiments, wherein said linker (L) is selected from the group consisting of a cleavable linker, a non-cleavable linker, a hydrophilic linker, a procharged linker and a dicarboxylic acid based linker.

[0018] The antibody drug conjugate according to any of the preceding embodiments, wherein the linker is derived from a cross-linking reagent selected from the group consisting of: N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)2-sulfo-butanoate (sulfo-SPDB), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB), N-succinimidyl iodoacetate (SIA), N-

OnCusp
Ex. 1002

succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate (SIAB), maleimide PEG NHS, N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate (SMCC), N- sulfosuccinimidyl 4-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate (sulfo-SMCC) or 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oate (CX1-1).

[0019] The antibody drug conjugate according to any of the preceding embodiments, wherein said linker is derived from N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)2-sulfo-butanoate (sulfo-SPDB).

[0020] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said drug moiety (D) is selected from a group consisting of: a maytansinoid, a V-ATPase inhibitor, a pro-apoptotic agent, a Bcl2 inhibitor, an MCL1 inhibitor, a HSP90 inhibitor, an IAP inhibitor, an mTor inhibitor, a microtubule stabilizer, a microtubule destabilizer, an auristatin, a dolastatin, a MetAP (methionine aminopeptidase), an inhibitor of nuclear export of proteins CRM1, a DPPIV inhibitor, proteasome inhibitors, inhibitors of phosphoryl transfer reactions in mitochondria, a protein synthesis inhibitor, a kinase inhibitor, a CDK2 inhibitor, a CDK9 inhibitor, a kinesin inhibitor, an HDAC inhibitor, a DNA damaging agent, a DNA alkylating agent, a DNA intercalator, a DNA minor groove binder and a DHFR inhibitor.

[0021] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein the drug moiety is a maytansinoid.

[0022] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein the maytansinoid is N(2')-deacetyl-N2-(4- mercapto-4-methyl- 1 -oxopentyl)-maytansine (DM4) or N(2')-deacetyl-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine (DM1).

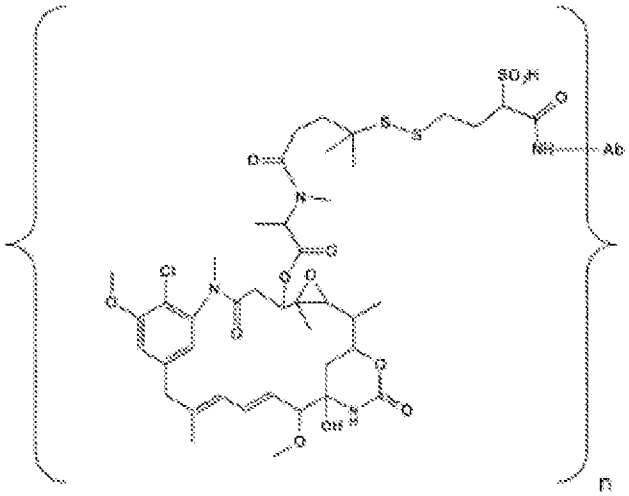
[0023] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with another therapeutic agent.

[0024] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with a therapeutic agent listed in Table 18.

[0025] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.

[0026] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with an immune modulatory molecule.

[0027] An antibody drug conjugate of the formula:



Ab-sulfo-SPDB-DM4

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein;
Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to human CDH6, and n is an integer from 1 to 10.

[0028] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment specifically binds to an epitope of human CDH6 at (SEQ ID NO:4).

[0029] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof specifically binds human CDH6 at (SEQ ID NO:534).

[0030] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof comprises:
(i) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:224, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:225, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:226; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 227, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 228, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:229;

(ii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:210, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:211, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:212; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:213, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 214, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:215;

(iii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:266, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:267, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:268; and

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 269, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:270, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 271;

(iv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:308, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:309, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:310; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:311, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:312, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:313;

(v) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:14, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:15, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:16; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:17, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:18, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:19;

(vi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:28, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:29, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:30; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:31, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:32, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:33;

(vii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:42, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:43, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:44; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:45, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:46, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:47;

(viii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:56, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:57, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:58; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:59, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:60, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:61;

(ix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:70, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:71, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:72; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:73, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:74, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:75;

(x) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:84, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:85, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:86; and a

heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:87, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 88, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 89;

(xi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:98, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:99, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:100; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:101, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:102, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:103;

(xii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:112, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:113, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:114; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:115, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:116, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:117;

(xiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:126, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:127, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:128; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:129, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:130, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:131;

(xiv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:140, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:141, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:142; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:143, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:144, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:145;

(xv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:154, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:155, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:156; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:157, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:158, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:159;

(xvi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:168, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:169, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:170; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:171, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:172, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:173;

(xvii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:182, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:183, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:184; and

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:185, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:186, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:187;

(xviii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:196, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:197, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:198; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:199, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:200, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:201;

(xix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:238, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:239, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:240; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:241, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:242, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:243;

(xx) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:252, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:253, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:254; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:255, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:256, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:257;

(xxi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:280, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:281, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:282; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:283, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:284, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:285;

(xxii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:294, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:295, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:296; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:297, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:298, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:299; or

(xxiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:322, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:323, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:324; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:325, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:326, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:327.

[0031] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-CDH6 antibody in Table 5 or 6.

[0032] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in which one or two amino acids within a CDR have been modified, deleted or substituted.

[0033] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 230, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:231;

(ii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 216, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:217;

(iii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 272, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:273;

(iv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:314, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:315;

(v) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:20, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:21;

(vi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 34, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:35;

(vii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:48, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:49;

(viii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:62, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:63;

(ix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:76, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:77;

(x) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:90, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:91;

(xi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:104, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:105;

(xii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 118, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:119;

(xiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 132, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:133;

(xiv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 146, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:147;

(xv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:160, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:161;

(xvi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 174, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:175;

(xvii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 188, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:189;

(xviii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 202, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:203;

(xix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 244, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:245;

(xx) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:258, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:259;

(xxi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:286, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:287;

(xxii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:300, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:301; or

(xxiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:328, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:329.

[0034] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments that retains at least 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 or 99% identity over either the variable light or variable heavy region.

[0035] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human engineered antibody, a human antibody, a single chain antibody(scFv) or an antibody fragment.

[0036] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said n is an integer from 2 to 8.

[0037] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, wherein said n is an integer from 3 to 4.

[0038] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with another therapeutic agent.

[0039] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with a therapeutic agent listed in Table 18.

[0040] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.

[0041] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with an immune modulatory molecule.

[0042] A pharmaceutical composition comprising the antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0043] The pharmaceutical composition of any of the preceding embodiments wherein said composition is prepared as a lyophilisate.

[0044] The pharmaceutical composition of any of the preceding embodiments, wherein said lyophilisate comprises the antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, sodium succinate, and polysorbate 20.

[0045] A method of treating an CDH6 positive cancer in a patient in need thereof, comprising administering to said patient the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition.

[0046] The method wherein said cancer is selected from the group consisting of: ovarian cancer, renal cancer, hepatic cancer, soft tissue cancer, CNS cancers, thyroid cancer and cholangiocarcinoma.

[0047] The method wherein the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition is administered in combination with another therapeutic agent.

[0048] The method wherein the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition is administered in combination with a therapeutic listed in Table 18.

[0049] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.

[0050] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with an immune modulatory molecule.

[0051] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments for use as a medicament.

[0052] The antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition thereof, for use in the treatment of a CDH6 positive cancer.

[0053] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments, administered in combination with another therapeutic agent.

[0054] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments administered in combination with a therapeutic agent listed in Table 18.

[0055] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.

[0056] The antibody drug conjugate of any of the preceding embodiments in combination with an immune modulatory molecule.

[0057] A nucleic acid that encodes the antibody or antigen binding fragment of any of the preceding embodiments.

[0058] A vector comprising the nucleic acid of any of the preceding embodiments.

[0059] A host cell comprising the vector according to any of the preceding embodiments.

[0060] A process for producing an antibody or antigen binding fragment comprising cultivating the host cell and recovering the antibody from the culture.

[0061] A process for producing an anti-CDH6 antibody drug conjugate, the process comprising:

(a) chemically linking N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)2-sulfo-butanoate (sulfo-SPDB) to a drug moiety DM-4;

(b) conjugating said linker-drug to the antibody recovered from the cell culture; and

(c) purifying the antibody drug conjugate.

[0062] The antibody drug conjugate made according to any of the preceding embodiments having an average maytansinoid to antibody ratio (MAR), measured with a UV spectrophotometer, about 3.5.

[0063] An antibody or antigen binding fragment thereof that comprises:

(i) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:224, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:225, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:226; and

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 227, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 228, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:229;

(ii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:210, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:211, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:212; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:213, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 214, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:215;

(iii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:266, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:267, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:268; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 269, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:270, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 271;

(iv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:308, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:309, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:310; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:311, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:312, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:313;

(v) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:14, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:15, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:16; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:17, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:18, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:19;

(vi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:28, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:29, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:30; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:31, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:32, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:33;

(vii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:42, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:43, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:44; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:45, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:46, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:47;

(viii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:56, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:57, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:58; and a

heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:59, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:60, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:61;

(ix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:70, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:71, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:72; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:73, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:74, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:75;

(x) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:84, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:85, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:86; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:87, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 88, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 89;

(xi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:98, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:99, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:100; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:101, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:102, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:103;

(xii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:112, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:113, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:114; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:115, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:116, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:117;

(xiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:126, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:127, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:128; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:129, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:130, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:131;

(xiv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:140, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:141, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:142; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:143, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:144, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:145;

(xv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:154, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:155, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:156; and

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:157, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:158, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:159;

(xvi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:168, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:169, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:170; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:171, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:172, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:173;

(xvii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:182, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:183, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:184; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:185, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:186, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:187;

(xviii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:196, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:197, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:198; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:199, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:200, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:201;

(xix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:238, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:239, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:240; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:241, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:242, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:243;

(xx) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:252, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:253, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:254; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:255, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:256, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:257;

(xxi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:280, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:281, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:282; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:283, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:284, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:285;

(xxii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:294, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:295, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:296; and

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:297, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:298, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:299; or

(xxiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:322, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:323, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:324; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:325, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:326, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:327.

[0064] The antibody or antigen binding fragment thereof of any of the preceding embodiments in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-CDH6 antibody in Table 5 or 6.

[0065] The antibody or antigen binding fragment thereof of any of the preceding embodiments, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:
(i) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 230, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:231;

(ii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 216, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:217;

(iii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 272, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:273;

(iv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:314, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:315;

(v) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:20, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:21;

(vi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 34, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:35;

(vii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:48, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:49;

(viii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:62, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:63;

(ix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:76, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:77;

(x) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:90, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:91;

(xi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:104, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:105;

(xii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 118, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:119;

(xiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 132, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:133;

(xiv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 146, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:147;

(xv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:160, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:161;

(xvi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 174, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:175;

(xvii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 188, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:189;

(xviii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 202, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:203;

(xix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 244, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:245;

(xx) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:258, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:259;

(xxi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:286, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:287;

(xxii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:300, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:301; or

(xxiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:328, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:329.

[0066] A diagnostic reagent comprising the antibody or antigen binding fragment thereof of any of the preceding embodiments which is labeled.

[0067] The diagnostic reagent of any of the preceding embodiments, wherein the label is selected from the group consisting of a radiolabel, a fluorophore, a chromophore, an imaging agent, and a metal ion.

Definitions

[0068] Unless stated otherwise, the following terms and phrases as used herein are intended to have the following meanings:

[0069] The term "alkyl" refers to a monovalent saturated hydrocarbon chain having the specified number of carbon atoms. For example, C_{1-6} alkyl refers to an alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms. Alkyl groups may be straight or branched. Representative branched alkyl groups have one, two, or three branches. Examples of alkyl groups include, but are not limited to, methyl, ethyl, propyl (n-propyl and isopropyl), butyl (n-butyl, isobutyl, sec-butyl, and t-butyl), pentyl (n-pentyl, isopentyl, and neopentyl), and hexyl.

[0070] The term "antibody" as used herein refers to a polypeptide of the immunoglobulin family that is capable of binding a corresponding antigen non-covalently, reversibly, and in a specific manner. For example, a naturally occurring IgG antibody is a tetramer comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as VH) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The VH and VL

regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, and FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

[0071] The term "antibody" includes, but is not limited to, monoclonal antibodies, human antibodies, humanized antibodies, camelid antibodies, chimeric antibodies, and anti-idiotypic (anti-Id) antibodies (including, *e.g.*, anti-Id antibodies to antibodies of the present disclosure). The antibodies can be of any isotype/class (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), or subclass (*e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2).

[0072] "Complementarity-determining domains" or "complementary-determining regions"("CDRs") interchangeably refer to the hypervariable regions of VL and VH. The CDRs are the target protein-binding site of the antibody chains that harbors specificity for such target protein. There are three CDRs (CDR1-3, numbered sequentially from the N-terminus) in each human VL or VH, constituting about 15-20% of the variable domains. CDRs can be referred to by their region and order. For example, "VHCDR1" or "HCDR1" both refer to the first CDR of the heavy chain variable region. The CDRs are structurally complementary to the epitope of the target protein and are thus directly responsible for the binding specificity. The remaining stretches of the VL or VH, the so-called framework regions, exhibit less variation in amino acid sequence (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0073] The positions of the CDRs and framework regions can be determined using various well known definitions in the art, *e.g.*, Kabat, Chothia, and AbM (see, *e.g.*, Johnson *et al.*, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, Nature, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Definitions of antigen combining sites are also described in the following: Ruiz *et al.*, Nucleic Acids Res., 28:219--221 (2000); and Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); and Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268--9272 (1989); Martin *et al.*, Methods Enzymol., 203:121--153 (1991); and

OnCusp
Ex. 1002

Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

[0074] Both the light and heavy chains are divided into regions of structural and functional homology. The terms "constant" and "variable" are used functionally. In this regard, it will be appreciated that the variable domains of both the light (VL) and heavy (VH) chain portions determine antigen recognition and specificity. Conversely, the constant domains of the light chain (CL) and the heavy chain (CH1, CH2 or CH3) confer important biological properties such as secretion, transplacental mobility, Fc receptor binding, complement binding, and the like. By convention, the numbering of the constant region domains increases as they become more distal from the antigen binding site or amino-terminus of the antibody. The N-terminus is a variable region and at the C-terminus is a constant region; the CH3 and CL domains actually comprise the carboxy-terminal domains of the heavy and light chain, respectively.

[0075] The term "antigen binding fragment", as used herein, refers to a polypeptide including one or more portions of an antibody that retain the ability to specifically interact with (*e.g.*, by binding, steric hindrance, stabilizing/destabilizing, spatial distribution) an epitope of an antigen. Examples of binding fragments include, but are not limited to, single-chain Fvs (scFv), disulfide-linked Fvs (sdFv), Fab fragments, F(ab') fragments, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; a F(ab)2 fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; a dAb fragment (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), which consists of a VH domain; and an isolated complementarity determining region (CDR), or other epitope-binding fragments of an antibody.

[0076] Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv ("scFv"); see, *e.g.*, Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988; and Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen binding fragment." These antigen binding fragments are obtained using conventional techniques known to those of skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

[0077] Antigen binding fragments can also be incorporated into single domain antibodies, maxibodies, minibodies, nanobodies, intrabodies, diabodies, triabodies, tetrabodies, v-NAR and bis-

OnCusp
Ex. 1002

scFv (see, *e.g.*, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Antigen binding fragments can be grafted into scaffolds based on polypeptides such as fibronectin type III (Fn3) (see U.S. Pat. No. 6,703,199, which describes fibronectin polypeptide monobodies).

[0078] Antigen binding fragments can be incorporated into single chain molecules comprising a pair of tandem Fv segments (VH-CH1-VH-CH1) which, together with complementary light chain polypeptides, form a pair of antigen binding regions (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8:1057-1062, 1995; and U.S. Pat. No. 5,641,870).

[0079] The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refers to polypeptides, including antibodies and antigen binding fragments that have substantially identical amino acid sequence or are derived from the same genetic source. This term also includes preparations of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

[0080] The term "human antibody", as used herein, includes antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from sequences of human origin. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from such human sequences, *e.g.*, human germline sequences, or mutated versions of human germline sequences or antibody containing consensus framework sequences derived from human framework sequences analysis, for example, as described in Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000.

[0081] The human antibodies of the present disclosure can include amino acid residues not encoded by human sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or site-specific mutagenesis in vitro or by somatic mutation in vivo, or a conservative substitution to promote stability or manufacturing).

[0082] The term "recognize" as used herein refers to an antibody or antigen binding fragment thereof that finds and interacts (*e.g.*, binds) with its epitope, whether that epitope is linear or conformational. The term "epitope" refers to a site on an antigen to which an antibody or antigen binding fragment of the disclosure specifically binds. Epitopes can be formed both from contiguous amino acids or noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids are typically retained on exposure to denaturing solvents, whereas epitopes formed by tertiary folding are typically lost on treatment with denaturing solvents. An epitope typically includes at least 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15 amino acids in a unique spatial conformation. Methods of determining spatial conformation of epitopes include techniques in the art, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance (see, *e.g.*,

Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). A "paratope" is the part of the antibody which recognizes the epitope of the antigen.

[0083] The phrase "specifically binds" or "selectively binds," when used in the context of describing the interaction between an antigen (*e.g.*, a protein) and an antibody, antibody fragment, or antibody-derived binding agent, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the antigen in a heterogeneous population of proteins and other biologics, *e.g.*, in a biological sample, *e.g.*, a blood, serum, plasma or tissue sample. Thus, under certain designated immunoassay conditions, the antibodies or binding agents with a particular binding specificity bind to a particular antigen at least two times the background and do not substantially bind in a significant amount to other antigens present in the sample. In one aspect, under designated immunoassay conditions, the antibody or binding agent with a particular binding specificity binds to a particular antigen at least ten (10) times the background and does not substantially bind in a significant amount to other antigens present in the sample. Specific binding to an antibody or binding agent under such conditions may require the antibody or agent to have been selected for its specificity for a particular protein. As desired or appropriate, this selection may be achieved by subtracting out antibodies that cross-react with molecules from other species (*e.g.*, mouse or rat) or other subtypes. Alternatively, in some aspects, antibodies or antibody fragments are selected that cross-react with certain desired molecules.

[0084] The term "affinity" as used herein refers to the strength of interaction between antibody and antigen at single antigenic sites. Within each antigenic site, the variable region of the antibody "arm" interacts through weak non-covalent forces with antigen at numerous sites; the more interactions, the stronger the affinity.

[0085] The term "isolated antibody" refers to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities. An isolated antibody that specifically binds to one antigen may, however, have cross-reactivity to other antigens. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

[0086] The term "corresponding human germline sequence" refers to the nucleic acid sequence encoding a human variable region amino acid sequence or subsequence that shares the highest determined amino acid sequence identity with a reference variable region amino acid sequence or subsequence in comparison to all other all other known variable region amino acid sequences encoded by human germline immunoglobulin variable region sequences. The corresponding human germline sequence can also refer to the human variable region amino acid sequence or subsequence with the highest amino acid sequence identity with a reference variable region amino acid sequence or

subsequence in comparison to all other evaluated variable region amino acid sequences. The corresponding human germline sequence can be framework regions only, complementarity determining regions only, framework and complementary determining regions, a variable segment (as defined above), or other combinations of sequences or subsequences that comprise a variable region. Sequence identity can be determined using the methods described herein, for example, aligning two sequences using BLAST, ALIGN, or another alignment algorithm known in the art. The corresponding human germline nucleic acid or amino acid sequence can have at least about 90%, 91, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% sequence identity with the reference variable region nucleic acid or amino acid sequence.

[0087] A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (see, *e.g.*, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity). Typically a specific or selective binding reaction will produce a signal at least twice over the background signal and more typically at least 10 to 100 times over the background.

[0088] The term "equilibrium dissociation constant (KD, M)" refers to the dissociation rate constant (kd, time-1) divided by the association rate constant (ka, time-1, M-1). Equilibrium dissociation constants can be measured using any known method in the art. The antibodies of the present disclosure generally will have an equilibrium dissociation constant of less than about 10^{-7} or 10^{-8} M, for example, less than about 10^{-9} M or 10^{-10} M, in some aspects, less than about 10^{-11} M, 10^{-12} M or 10^{-13} M.

[0089] The term "bioavailability" refers to the systemic availability (i.e., blood/plasma levels) of a given amount of drug administered to a patient. Bioavailability is an absolute term that indicates measurement of both the time (rate) and total amount (extent) of drug that reaches the general circulation from an administered dosage form.

[0090] As used herein, the phrase "consisting essentially of" refers to the genera or species of active pharmaceutical agents included in a method or composition, as well as any excipients inactive for the intended purpose of the methods or compositions. In some aspects, the phrase "consisting essentially of" expressly excludes the inclusion of one or more additional active agents other than an antibody drug conjugate of the present disclosure. In some aspects, the phrase "consisting essentially

of" expressly excludes the inclusion of one or more additional active agents other than an antibody drug conjugate of the present disclosure and a second co-administered agent.

[0091] The term "amino acid" refers to naturally occurring, synthetic, and unnatural amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, *e.g.*, hydroxyproline, γ-carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refer to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, i.e., an α-carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, *e.g.*, homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (*e.g.*, norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that functions in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

[0092] The term "conservatively modified variant" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

[0093] For polypeptide sequences, "conservatively modified variants" include individual substitutions, deletions or additions to a polypeptide sequence which result in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing

functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles. The following eight groups contain amino acids that are conservative substitutions for one another: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (see, e.g., Creighton, Proteins (1984)). In some aspects, the term "conservative sequence modifications" are used to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence.

[0094] The term "optimized" as used herein refers to a nucleotide sequence that has been altered to encode an amino acid sequence using codons that are preferred in the production cell or organism, generally a eukaryotic cell, for example, a yeast cell, a Pichia cell, a fungal cell, a Trichoderma cell, a Chinese Hamster Ovary cell (CHO) or a human cell. The optimized nucleotide sequence is engineered to retain completely or as much as possible the amino acid sequence originally encoded by the starting nucleotide sequence, which is also known as the "parental" sequence.

[0095] The terms "percent identical" or "percent identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refers to the extent to which two or more sequences or subsequences that are the same. Two sequences are "identical" if they have the same sequence of amino acids or nucleotides over the region being compared. Two sequences are "substantially identical" if two sequences have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (i.e., 60% identity, optionally 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, or 99% identity over a specified region, or, when not specified, over the entire sequence), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window, or designated region as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by manual alignment and visual inspection. Optionally, the identity exists over a region that is at least about 30 nucleotides (or 10 amino acids) in length, or more preferably over a region that is 100 to 500 or 1000 or more nucleotides (or 20, 50, 200 or more amino acids) in length.

[0096] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the

percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

[0097] A "comparison window", as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970), by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (see, *e.g.*, Brent *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

[0098] Two examples of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; and Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, supra). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide

sequences) uses as defaults a word length (W) of 11, an expectation (E) or 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a word length of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands.

[0099] The BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

[00100] The percent identity between two amino acid sequences can also be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package using either a Blossom 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

[00101] Other than percentage of sequence identity noted above, another indication that two nucleic acid sequences or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the antibodies raised against the polypeptide encoded by the second nucleic acid, as described below. Thus, a polypeptide is typically substantially identical to a second polypeptide, for example, where the two peptides differ only by conservative substitutions. Another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules or their complements hybridize to each other under stringent conditions, as described below. Yet another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the same primers can be used to amplify the sequence.

[00102] The term "nucleic acid" is used herein interchangeably with the term "polynucleotide" and refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-

stranded form. The term encompasses nucleic acids containing known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring, which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs).

[00103] Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (*e.g.*, degenerate codon substitutions) and complementary sequences, as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, as detailed below, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.*, (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka *et al.*, (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; and Rossolini *et al.*, (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98).

[00104] The term "operably linked" in the context of nucleic acids refers to a functional relationship between two or more polynucleotide (*e.g.*, DNA) segments. Typically, it refers to the functional relationship of a transcriptional regulatory sequence to a transcribed sequence. For example, a promoter or enhancer sequence is operably linked to a coding sequence if it stimulates or modulates the transcription of the coding sequence in an appropriate host cell or other expression system. Generally, promoter transcriptional regulatory sequences that are operably linked to a transcribed sequence are physically contiguous to the transcribed sequence, i.e., they are cis-acting. However, some transcriptional regulatory sequences, such as enhancers, need not be physically contiguous or located in close proximity to the coding sequences whose transcription they enhance.

[00105] The terms "polypeptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymer. Unless otherwise indicated, a particular polypeptide sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof.

[00106] The term "immunoconjugate" or "antibody drug conjugate" as used herein refers to the linkage of an antibody or an antigen binding fragment thereof with another agent, such as a payload, drug moiety, chemotherapeutic agent, a toxin, an immunotherapeutic agent, an imaging probe, and the like. The linkage can be covalent bonds, or non-covalent interactions such as through

electrostatic forces. Various linkers, known in the art, can be employed in order to form the immunoconjugate. Additionally, the immunoconjugate can be provided in the form of a fusion protein that may be expressed from a polynucleotide encoding the immunoconjugate. As used herein, "fusion protein" refers to proteins created through the joining of two or more genes or gene fragments which originally coded for separate proteins (including peptides and polypeptides). Translation of the fusion gene results in a single protein with functional properties derived from each of the original proteins.

[00107] The term "subject" includes human and non-human animals. Non-human animals include all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dog, cow, chickens, amphibians, and reptiles. Except when noted, the terms "patient" or "subject" are used herein interchangeably.

[00108] The term "toxin," "cytotoxin" or "cytotoxic agent" as used herein, refers to any agent that is detrimental to the growth and proliferation of cells and may act to reduce, inhibit, or destroy a cell or malignancy.

[00109] The term "anti-cancer agent" as used herein refers to any agent that can be used to treat a cell proliferative disorder such as cancer, including but not limited to, cytotoxic agents, chemotherapeutic agents, radiotherapy and radiotherapeutic agents, targeted anti-cancer agents, and immunotherapeutic agents.

[00110] The term "drug moiety" or "payload" as used herein refers to a chemical moiety that is conjugated to an antibody or antigen binding fragment, and can include any therapeutic or diagnostic agent. for example, an anti-cancer, anti-inflammatory, anti-infective (*e.g.*, anti-fungal, antibacterial, anti-parasitic, anti-viral), or an anesthetic agent. In certain aspects, a drug moiety is selected from a V-ATPase inhibitor, a HSP90 inhibitor, an IAP inhibitor, an mTor inhibitor, a microtubule stabilizer, a microtubule destabilizer, an auristatin, a dolastatin, a maytansinoid, a MetAP (methionine aminopeptidase), an inhibitor of nuclear export of proteins CRM1, a DPPIV inhibitor, an inhibitor of phosphoryl transfer reactions in mitochondria, a protein synthesis inhibitor, a kinase inhibitor, a CDK2 inhibitor, a CDK9 inhibitor, a proteasome inhibitor, a kinesin inhibitor, an HDAC inhibitor, a DNA damaging agent, a DNA alkylating agent, a DNA intercalator, a DNA minor groove binder and a DHFR inhibitor. Methods for attaching each of these to a linker compatible with the antibodies and method of the present disclosure are known in the art. See, e.g., Singh et al., (2009) Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols, vol. 525, 445-457. In addition, a payload can be a biophysical probe, a fluorophore, a spin label, an infrared probe, an affinity probe, a chelator, a spectroscopic probe, a radioactive probe, a lipid molecule, a polyethylene glycol, a polymer, a spin

label, DNA, RNA, a protein, a peptide, a surface, an antibody, an antibody fragment, a nanoparticle, a quantum dot, a liposome, a PLGA particle, a saccharide or a polysaccharide.

[00111] The term "maytansinoid drug moiety" means the substructure of an antibody-drug conjugate that has the structure of a maytansinoid compound. Maytansine was first isolated from the east African shrub Maytenus serrata (U.S. Pat. No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Pat. No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and maytansinol analogues have been reported. See U.S. Pat. Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; and 4,371,533, and Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451, each of which are expressly incorporated by reference. Specific examples of maytansinoids useful for conjugation include DM1, DM3 and DM4.

[00112] "Tumor" refers to neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

[00113] The term "anti-tumor activity" means a reduction in the rate of tumor cell proliferation, viability, or metastatic activity. A possible way of showing anti-tumor activity is to show a decline in growth rate of tumor cells, tumor size stasis or tumor size reduction. Such activity can be assessed using accepted in vitro or in vivo tumor models, including but not limited to xenograft models, allograft models, MMTV models, and other known models known in the art to investigate anti-tumor activity.

[00114] The term "malignancy" refers to a non-benign tumor or a cancer. As used herein, the term "cancer" includes a malignancy characterized by deregulated or uncontrolled cell growth. Exemplary cancers include: carcinomas, sarcomas, leukemias and lymphomas.

[00115] The term "cancer" includes primary malignant tumors (*e.g.*, those whose cells have not migrated to sites in the subject's body other than the site of the original tumor) and secondary malignant tumors (*e.g.*, those arising from metastasis, the migration of tumor cells to secondary sites that are different from the site of the original tumor).

[00116] The term "Cadherin 6" or "CDH6" refers to a cell adhesion molecule that is a member of the cadherin family of cell-cell adhesion molecules. The nucleic acid and amino acid sequences of CDH6 are known, and have been published in GenBank Accession Nos. AK291290 (protein accession number BAF83979.1) See also SEQ ID NO:1 for the human CDH6 cDNA sequence and SEQ ID NO:2 for the human CDH6 protein sequence. Structurally, CDH6 receptor is a type II cadherin with

five extracellular cadherin repeats and has over its full length at least about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% sequence identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Structurally, a CDH6 nucleic acid sequence has over its full length at least about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% sequence identity with the nucleic acid sequence of SEQ ID NO 1.

[00117] The terms "CDH6 expressing cancer" or "CDH6 positive cancer" refers to a cancer that express CDH6 and/or a mutant form of CDH6 on the surface of cancer cells.

[00118] As used herein, the terms "treat," "treating," or "treatment" of any disease or disorder refer in one aspect, to ameliorating the disease or disorder (i.e., slowing or arresting or reducing the development of the disease or at least one of the clinical symptoms thereof). In another aspect, "treat," "treating," or "treatment" refers to alleviating or ameliorating at least one physical parameter including those which may not be discernible by the patient. In yet another aspect, "treat," "treating," or "treatment" refers to modulating the disease or disorder, either physically, (*e.g.*, stabilization of a discernible symptom), physiologically, (*e.g.*, stabilization of a physical parameter), or both. In yet another aspect, "treat," "treating," or "treatment" refers to preventing or delaying the onset or development or progression of the disease or disorder.

[00119] The term "therapeutically acceptable amount" or "therapeutically effective dose" interchangeably refers to an amount sufficient to effect the desired result (i.e., a reduction in tumor size, inhibition of tumor growth, prevention of metastasis, inhibition or prevention of viral, bacterial, fungal or parasitic infection). In some aspects, a therapeutically acceptable amount does not induce or cause undesirable side effects. A therapeutically acceptable amount can be determined by first administering a low dose, and then incrementally increasing that dose until the desired effect is achieved. A "prophylactically effective dosage," and a "therapeutically effective dosage," of the molecules of the present disclosure can prevent the onset of, or result in a decrease in severity of, respectively, disease symptoms, including symptoms associated with cancer.

[00120] The term "co-administer" refers to the simultaneous presence of two active agents in the blood of an individual. Active agents that are co-administered can be concurrently or sequentially delivered.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[00121] Figure 1 is a graphic depiction of anti-CDH6 antibodies cellular binding EC50 on OVCAR3 cells.

[00122] Figure 2 shows epitope binning of anti-CDH6 antibodies.

[00123] Figure 3 represents deuterium mapping of the five EC domains of CDH6.

[00124] Figure 4 is the crystal structure of NOV0710 binding to CDH6 EC5 domain overlaid onto the known structure of the CDH2 ECD.

[00125] Figure 5 depicts the crystal structure of NOV0712 binding to CDH6.

[00126] Figure 6 depicts the crystal structure of NOV0710 binding to CDH6.

[00127] Figure 7 is an ELISA assay showing the ability of three anti-CDH6 antibodies to bind to mutant forms of CDH6.

[00128] Figure 8 is FACS data of anti-CDH6 antibodies either unconjugated or conjugated with a sulfo-SPDB-DM4 linker/payload binding to CHO cell lines expressing human, cynomolgus, rat or mouse CDH6.

[00129] Figure 9 are FACS graphics showing the levels of CDH6 expression on ovarian cancer cell lines, including CDH6 transfected lines and lines with CDH6 siRNA knockdown.

[00130] Figure 10 shows anti-CDH6 antibodies either unconjugated or conjugated with a sulfo-SPDB-DM4 linker/payload in a panel of ovarian cancer cell lines.

[00131] Figure 11 shows in vitro activity of anti-CDH6 antibodies when conjugated to DM1 or DM4 on ovarian cancer cell lines.

[00132] Figure 12 shows *in vitro* activity of unconjugated anti-CDH6 antibodies or anti-CDH6 antibodies conjugated to sulfo-SPDB-DM4.

[00133] Figure 13 demonstrates the efficacy of anti-CDH6 antibodies when conjugated to DM1 and tested in an ovarian cancer xenograft mouse model.

[00134] Figure 14 demonstrates the efficacy of anti-CDH6 antibodies when conjugated to DM1 and tested in an ovarian cancer xenograft mouse model.

[00135] Figure 15 shows the efficacy of anti-CDH6 antibodies when SPDB-DM4 conjugated and tested in an ovarian cancer xenograft mouse model.

[00136] Figure 16 compares the efficacy of NOV0712-SPDB-DM4 and NOV0712-SMCC-DM1 in an ovarian cancer xenograft mouse model.

[00137] Figure 17 compares the efficacy of NOV0712 with SPDB-DM4, sulfo-SPDB-DM4 and SMCC-DM1 linker/payload combinations in patient-derived primary tumor xenograft (PTX) mouse model of ovarian cancer.

[00138] Figure 18 shows the efficacy of different doses of NOV0712 when conjugated to SPDB-DM4 or sulfo-SPDB-DM4 in an ovarian cancer xenograft mouse model.

[00139] Figure 19 compares NOV0712 with sulfo-SPDB-DM4 with SMCC-DM1 linker payload combinations in a patient-derived primary ovarian tumor xenograft mouse model.

[00140] Figure 20 demonstrates the in vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies conjugated to sulfo-SPDB-DM4 in a patient derived primary xenograft mouse model of ovarian cancer.

[00141] Figure 21 shows in vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies conjugated to sulfo-SPDB-DM4 in a patient derived primary xenograft mouse model of renal cancer.

[00142] Figure 22 shows in vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies conjugated to sulfo-SPDB-DM4 in a patient derived primary xenograft mouse model of renal cancer.

[00143] Figure 23 shows in vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies conjugated to sulfo-SPDB-DM4 in a patient derived primary xenograft mouse model of renal cancer.

[00144] Figure 24 provides the Loewe Synergy scores for combination activity of CDH6-targeting ADCs with BCL2/BCL-XL, BCL-XL, IAP and MEK inhibitors.

[00145] Figure 25 is a graphic representation of CDH6 mRNA expression in cancerous tissues.

[00146] Figure 26 is a graphical representation of CDH6 protein expression by immunohistochemistry in ovarian cancer, endometrial cancer, renal cancer and cholangiocarcinoma tissue.

DETAILED DESCRIPTION

[00147] The present disclosure provides for antibodies, antibody fragments (*e.g.*, antigen binding fragments), and antibody drug conjugates that bind to CDH6. In particular, the present disclosure is directed to antibodies and antibody fragments (*e.g.*, antigen binding fragments) that bind to CDH6, and internalize upon such binding. The antibodies and antibody fragments (*e.g.*, antigen binding fragments) of the present disclosure can be used for producing antibody drug conjugates. Furthermore, the present disclosure provides antibody drug conjugates that have desirable pharmacokinetic characteristics and other desirable attributes, and thus can be used for treating cancer expressing CDH6, without limitation, for example: ovarian cancer, renal cancer, hepatic cancer, soft tissue cancer, CNS cancers, thyroid cancer and cholangiocarcinoma. The present disclosure further provides pharmaceutical compositions comprising the antibody drug conjugates, and methods of making and using such pharmaceutical compositions for the treatment of cancer.

Antibody Drug Conjugates

[00148] The present disclosure provides antibody drug conjugates, where an antibody, antigen binding fragment or its functional equivalent that specifically binds to CDH6 is linked to a drug

moiety. In one aspect, the antibodies, antigen binding fragments or their functional equivalents are linked, via covalent attachment by a linker, to a drug moiety that is an anti-cancer agent. The antibody drug conjugates can selectively deliver an effective dose of an anti-cancer agent (e.g., a cytotoxic agent) to tumor tissues expressing CDH6, whereby greater selectivity (and lower efficacious dose) may be achieved.

[00149] In one aspect, the disclosure provides for an immunoconjugate of Formula (I):

$$Ab—(L—(D)_m)_n$$

Wherein Ab represents an CDH6 binding antibody or antibody fragment (*e.g.*, antigen binding fragment) described herein;

L is a linker;

D is a drug moiety;

m is an integer from 1-8; and

n is an integer from 1-20. In one aspect, n is an integer from 1 to 10, 2 to 8, or 2 to 5. In a specific aspect, n is 3 to 4. In some aspects, m is 1. In some aspects, m is 2, 3 or 4.

[00150] While the drug moiety to antibody ratio has an exact integer value for a specific conjugate molecule (e.g., n multiplied by m in Formula (I)), it is understood that the value will often be an average value when used to describe a sample containing many molecules, due to some degree of inhomogeneity, typically associated with the conjugation step. The average loading for a sample of an immunoconjugate is referred to herein as the drug moiety to antibody ratio, or "DAR." In the aspect of maytansinoids, this can be referred to as maytansinoid to antibody ratio or "MAR." In some aspects, the DAR is between about 1 and about 5, and typically is about 3, 3.5, 4, 4.5, or 5. In some aspects, at least 50% of a sample by weight is compound having the average DAR plus or minus 2, and preferably at least 50% of the sample is a conjugate that contains the average DAR plus or minus 1. Other aspects include immunoconjugates wherein the DAR is about 3.5. In some aspects, a DAR of 'about n' means the measured value for DAR is within 20% of n.

[00151] The present disclosure provides immunoconjugates comprising the antibodies, antibody fragments (*e.g.*, antigen binding fragments) and their functional equivalents as disclosed herein, linked or conjugated to a drug moiety. In one aspect, the drug moiety D is a maytansinoid drug moiety, including those having the structure: