$-NS(O)_2-$, $-OS(O)_2-$, optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

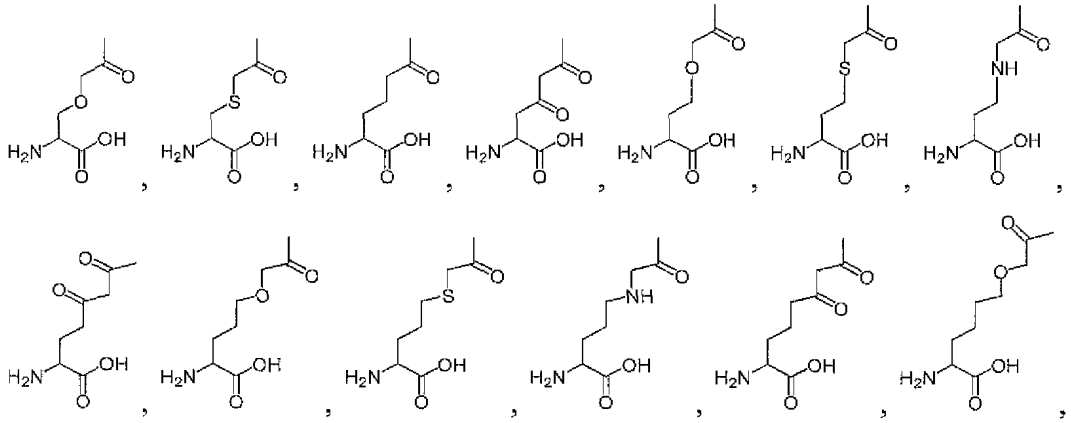
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

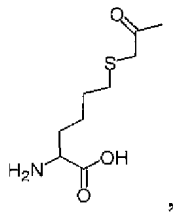
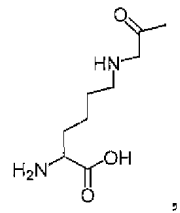
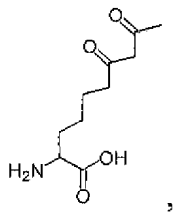
R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ where k is 1, 2, or 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl; and n is 0 to 8;

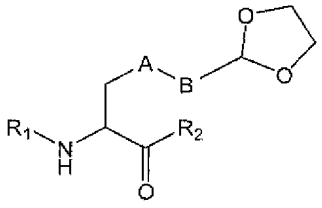
with a proviso that when A is $-(CH_2)_4-$, B is not $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$. Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[272] In addition, the following amino acids are included:




, 
, and 
, wherein such compounds are optionally amino protected, optionally carboxyl protected, optionally amino protected and carboxyl protected, or a salt thereof, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[273] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXI) are included:


(XXXXI),

wherein,

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

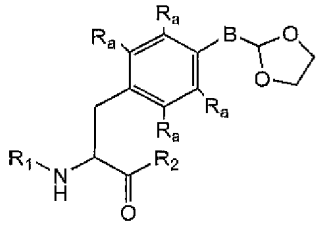
B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, $-NS(O)_2-$, $-OS(O)_2-$, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[274] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXII) are included:



(XXXXII),

wherein,

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, $-NS(O)_2-$, $-OS(O)_2-$, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

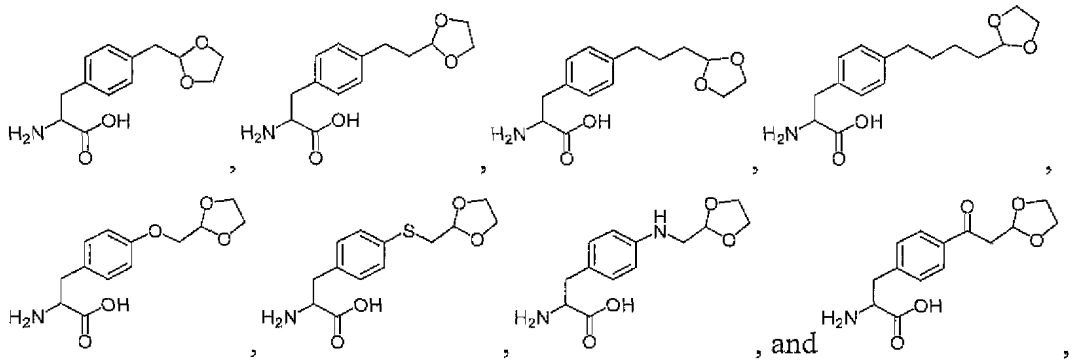
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

wherein each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ where k is 1, 2, or 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl.

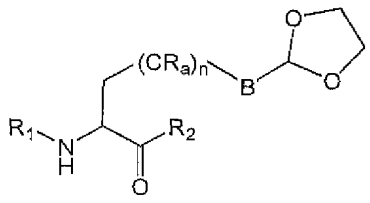
Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[275] In addition, the following amino acids are included:



wherein such compounds are optionally amino protected, optionally carboxyl protected, optionally amino protected and carboxyl protected, or a salt thereof, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[276] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXIV) are included:



(XXXXIV),

wherein,

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, $-NS(O)_2-$, $-OS(O)_2-$, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

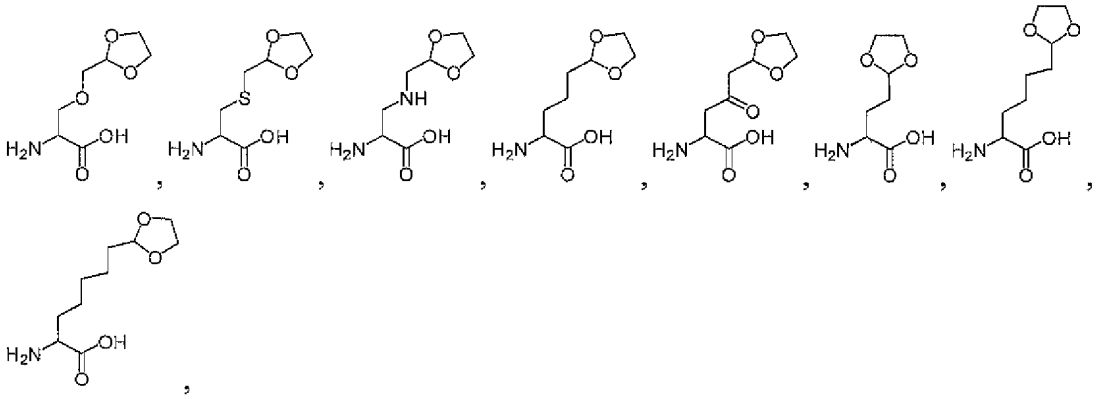
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ where k is 1, 2, or 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, and $-S(O)_kR'$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl; and n is 0 to 8.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[277] In addition, the following amino acids are included:

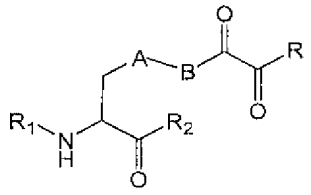


and

wherein such compounds are optionally amino protected, optionally carboxyl protected, optionally amino protected and carboxyl protected, or a salt thereof, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[278] In addition to monocarbonyl structures, the non-natural amino acids described herein may include groups such as dicarbonyl, dicarbonyl like, masked dicarbonyl and protected dicarbonyl groups.

For example, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXV) are included:



(XXXXV),

wherein,

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower

heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, $-NS(O)_2-$, $-OS(O)_2-$, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

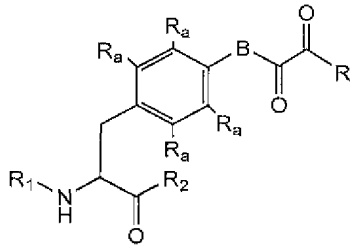
R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[279] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXVI) are included:



(XXXXVI),

wherein,

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, -

$S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, $-NS(O)_2$-, $-OS(O)_2$-, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, $-N(R')C(O)O$-, $-S(O)_kN(R')$-, $-N(R')C(O)N(R')$-, $-N(R')C(S)N(R')$-, $-N(R')S(O)_kN(R')$-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2$-N=N-, and $-C(R')_2$-N(R')-N(R')-, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

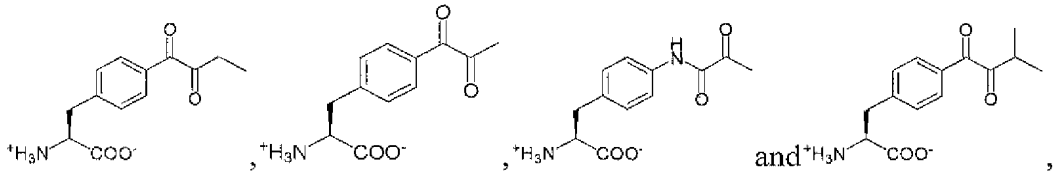
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

wherein each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ where k is 1, 2, or 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl.

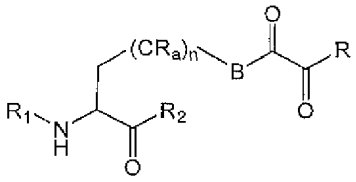
Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[280] In addition, the following amino acids are included:



wherein such compounds are optionally amino protected and carboxyl protected, or a salt thereof. Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[281] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXVII) are included:



(XXXXVII),

wherein,

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, $-NS(O)_2-$, $-OS(O)_2-$, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

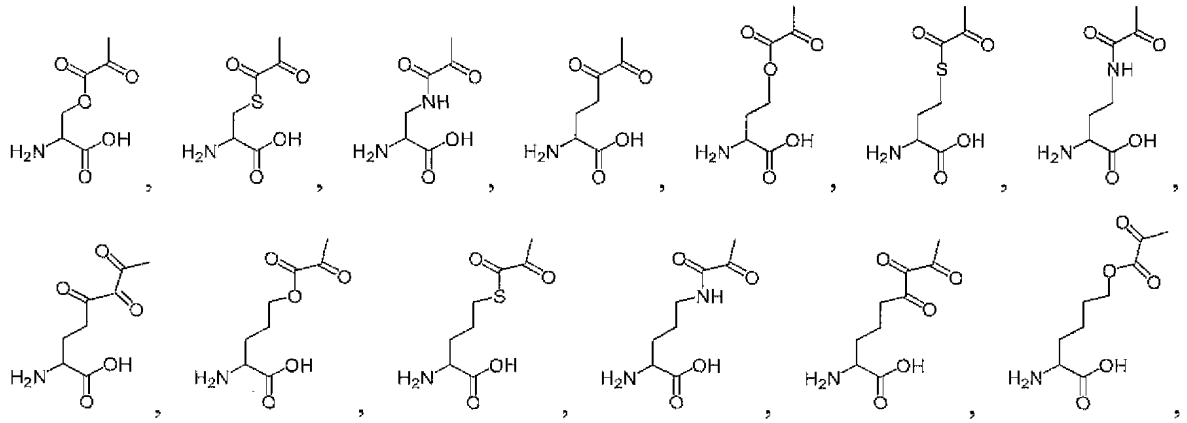
R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

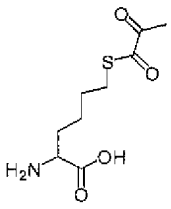
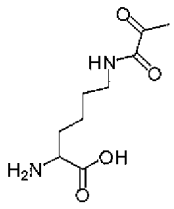
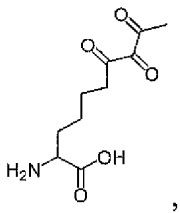
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

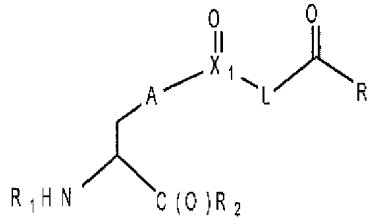
each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ where k is 1, 2, or 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl; and n is 0 to 8. Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[282] In addition, the following amino acids are included:





, and  , wherein such compounds are optionally amino protected and carboxyl protected, or a salt thereof, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[283] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXVIII) are included:


(XXXXVIII);

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

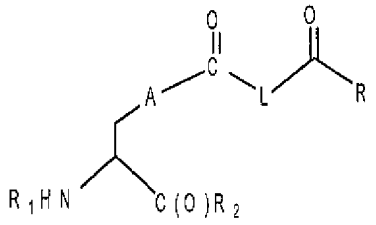
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

X_1 is C, S, or S(O); and L is alkylene, substituted alkylene, N(R')(alkylene) or N(R')(substituted alkylene), where R' is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[284] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXIX) are included:



(XXXXIX)

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

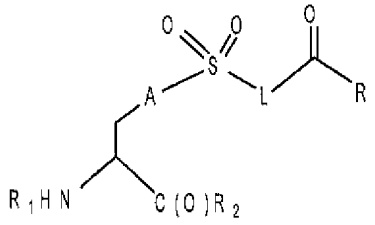
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

L is alkylene, substituted alkylene, N(R')(alkylene) or N(R')(substituted alkylene), where R' is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[285] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXX) are included:



(XXXXX)

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

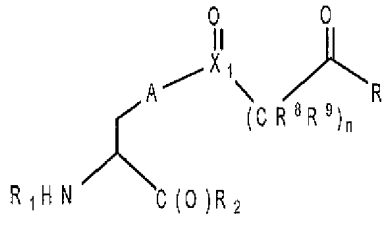
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

L is alkylene, substituted alkylene, N(R')(alkylene) or N(R')(substituted alkylene), where R' is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[286] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXXI) are included:



(XXXXXI);

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

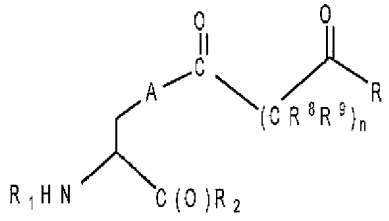
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

X_1 is C, S, or S(O); and n is 0, 1, 2, 3, 4, or 5; and each R^8 and R^9 on each CR^8R^9 group is independently selected from the group consisting of H, alkoxy, alkylamine, halogen, alkyl, aryl, or any R^8 and R^9 can together form =O or a cycloalkyl, or any to adjacent R^8 groups can together form a cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[287] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXXII) are included:



(XXXXXII)

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

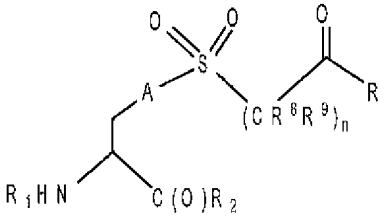
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

n is 0, 1, 2, 3, 4, or 5; and each R^8 and R^9 on each CR^8R^9 group is independently selected from the group consisting of H, alkoxy, alkylamine, halogen, alkyl, aryl, or any R^8 and R^9 can together form =O or a cycloalkyl, or any to adjacent R^8 groups can together form a cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[288] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXXIII) are included:



(XXXXXIII)

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene,

heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

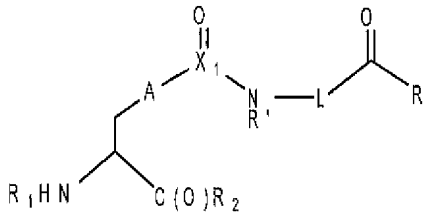
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

n is 0, 1, 2, 3, 4, or 5; and each R^8 and R^9 on each CR^8R^9 group is independently selected from the group consisting of H, alkoxy, alkylamine, halogen, alkyl, aryl, or any R^8 and R^9 can together form =O or a cycloalkyl, or any to adjacent R^8 groups can together form a cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[289] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXXIV) are included:



(XXXXXIV);

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

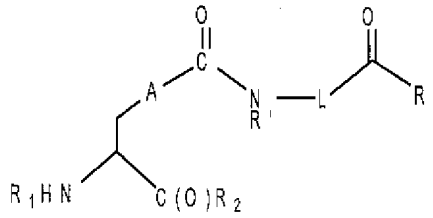
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

X_1 is C, S, or S(O); and L is alkylene, substituted alkylene, N(R')(alkylene) or N(R')(substituted alkylene), where R' is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[290] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXXV) are included:



(XXXXXV)

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

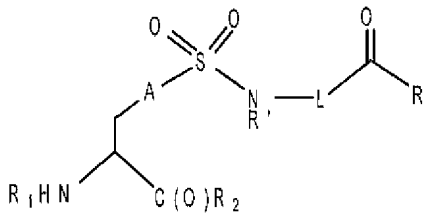
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

L is alkylene, substituted alkylene, N(R')(alkylene) or N(R')(substituted alkylene), where R' is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[291] In addition, the following amino acids having the structure of Formula (XXXXXVI) are included:



(XXXXXVI)

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

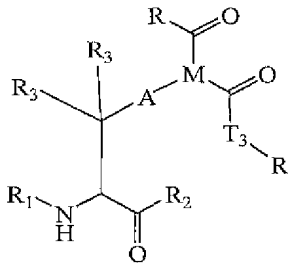
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

L is alkylene, substituted alkylene, N(R')(alkylene) or N(R')(substituted alkylene), where R' is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

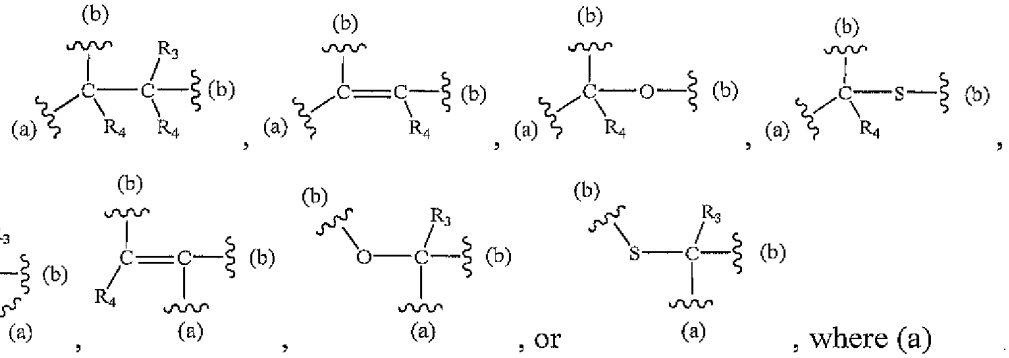
[292] In addition, amino acids having the structure of Formula (XXXXXVII) are included:



(XXXXXVII),

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

M is -C(R_3)-,  , where (a) indicates bonding to the A group and (b) indicates bonding to respective carbonyl groups, R_3 and R_4 are independently chosen from H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups or two R_4 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

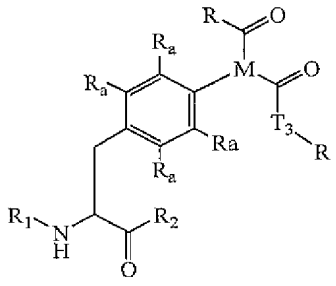
T_3 is a bond, C(R)(R), O, or S, and R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide.

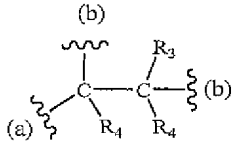
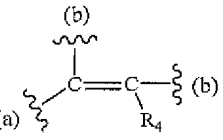
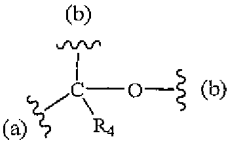
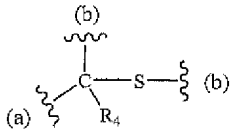
Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

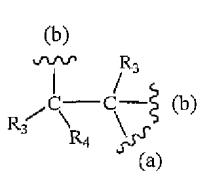
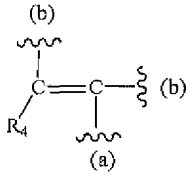
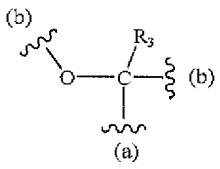
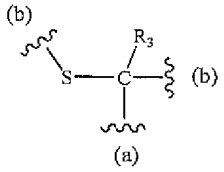
[293] In addition, amino acids having the structure of Formula (XXXXXVIII) are included:



(XXXXXVIII),

wherein:

M is -C(R_3)-,  ,  ,  ,  ,

 ,  ,  , or  , where (a) indicates bonding to the A group and (b) indicates bonding to respective carbonyl groups,

R_3 and R_4 are independently chosen from H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups or two R_4 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

T_3 is a bond, C(R)(R), O, or S, and R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

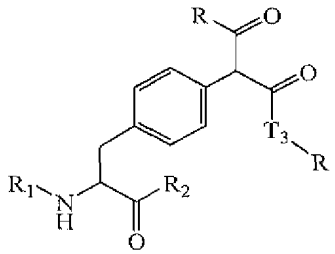
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, -N(R')$_2$, -C(O)$_k$R' where k is 1, 2, or 3, -C(O)N(R')$_2$, -OR', and -S(O)$_k$R', where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[294] In addition, amino acids having the structure of Formula (XXXXXIX) are included:



(XXXXXIX),

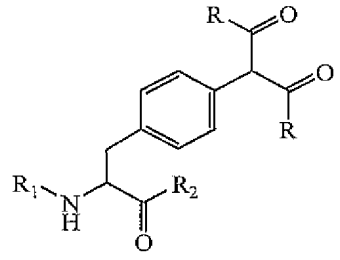
wherein:

R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl; and

T_3 is O, or S.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[295] In addition, amino acids having the structure of Formula (XXXXXX) are included:

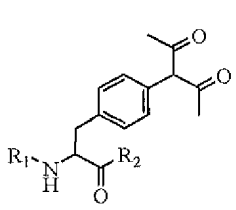


(XXXXXX),

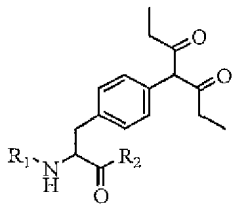
wherein:

R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl.

[296] In addition, the following amino acids having structures of Formula (XXXXXX) are included:



, and



.

Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[297] The carbonyl or dicarbonyl functionality can be reacted selectively with a hydroxylamine-containing reagent under mild conditions in aqueous solution to form the corresponding oxime linkage that is stable under physiological conditions. See, e.g., Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117(14):3893-3899 (1995). Moreover, the unique reactivity of the carbonyl or dicarbonyl group allows for selective modification in the presence of the other amino acid side chains. See, e.g., Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997).

[298] The synthesis of p-acetyl-(+/-)-phenylalanine and m-acetyl-(+/-)-phenylalanine is described in Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), incorporated by reference. Other carbonyl- or dicarbonyl-containing amino acids can be similarly prepared.

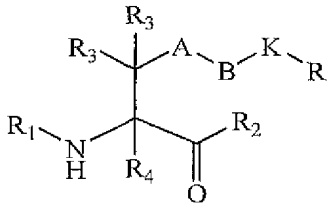
[299] In some embodiments, a polypeptide comprising a non-natural amino acid is chemically modified to generate a reactive carbonyl or dicarbonyl functional group. For instance, an aldehyde functionality useful for conjugation reactions can be generated from a functionality having adjacent amino and hydroxyl groups. Where the biologically active molecule is a polypeptide, for example, an N-terminal serine or threonine (which may be normally present or may be exposed via chemical or enzymatic digestion) can be used to generate an aldehyde functionality under mild oxidative cleavage conditions using periodate. See, e.g., Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994). However, methods known in the art are restricted to the amino acid at the N-terminus of the peptide or protein.

[300] Additionally, by way of example a non-natural amino acid bearing adjacent hydroxyl and amino groups can be incorporated into a polypeptide as a "masked" aldehyde functionality. For example, 5-hydroxylysine bears a hydroxyl group adjacent to the epsilon amine. Reaction conditions for generating the aldehyde typically involve addition of molar excess of sodium metaperiodate under mild conditions to avoid oxidation at other sites within the polypeptide. The pH of the oxidation reaction is typically about 7.0. A typical reaction involves the addition of about 1.5 molar excess of sodium meta periodate to a buffered solution of the polypeptide, followed by incubation for about 10 minutes in the dark. See, e.g. U.S. Patent No. 6,423,685.

B. Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Dicarbonyl, Dicarbonyl-like, Masked Dicarbonyl, and Protected Dicarbonyl Groups

[301] Amino acids with an electrophilic reactive group allow for a variety of reactions to link molecules via nucleophilic addition reactions among others. Such electrophilic reactive groups include a dicarbonyl group (including a diketone group, a ketoaldehyde group, a ketoacid group, a ketoester group, and a ketothioester group), a dicarbonyl-like group (which has reactivity similar to a dicarbonyl group and is structurally similar to a dicarbonyl group), a masked dicarbonyl group (which can be readily converted into a dicarbonyl group), or a protected dicarbonyl group (which has reactivity similar to a dicarbonyl group upon

deprotection). Such amino acids include amino acids having the structure of Formula (XXXVII):

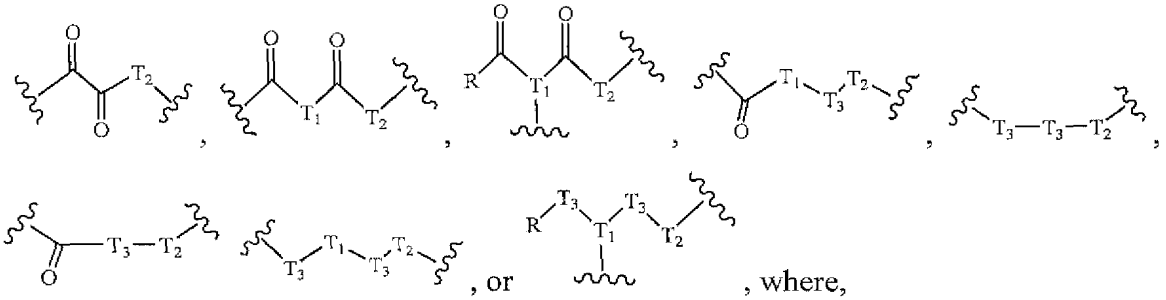


(XXXVII),

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker linked at one end to a diamine containing moiety, the linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)R"-, -S(O)$_k$(alkylene or substituted alkylene)-, where k is 1, 2, or 3, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -NR"-(alkylene or substituted alkylene)-, -CON(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, and -N(R")CO-(alkylene or substituted alkylene)-, where each R" is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

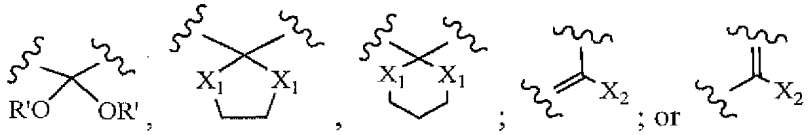
K is 

T_1 is a bond, optionally substituted C_1-C_4 alkylene, optionally substituted C_1-C_4 alkenylene, or optionally substituted heteroalkyl;

wherein each optional substituents is independently selected from lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted

heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

T_2, is selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

T_3 is  , where each X_1 is independently selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(H)-, -N(R)-, -N(Ac)-, and –N(OMe)-; X_2 is –OR, -OAc, -SR, $-N(R)_2$, -N(R)(Ac), -N(R)(OMe), or N_3, and where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

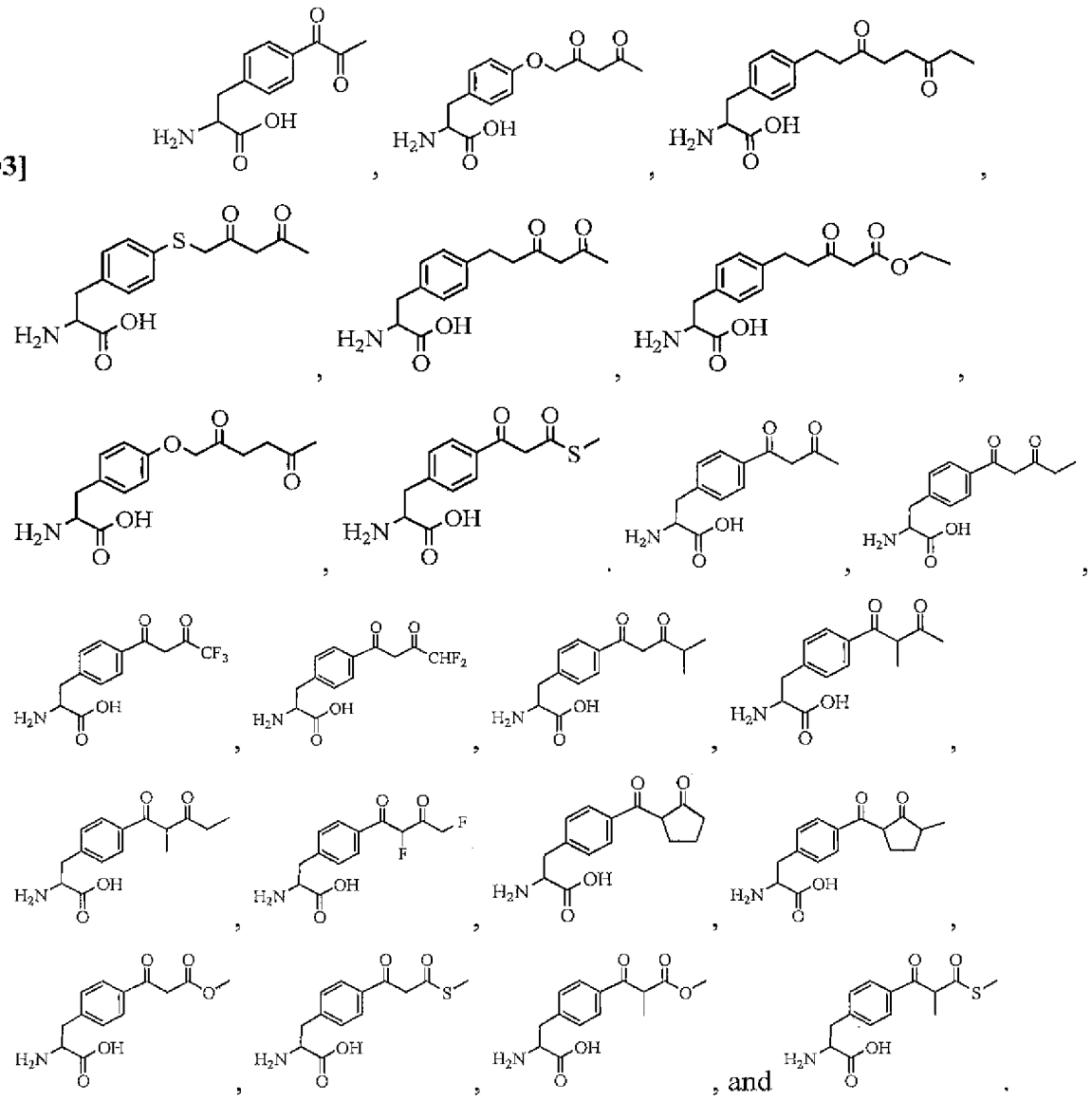
R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

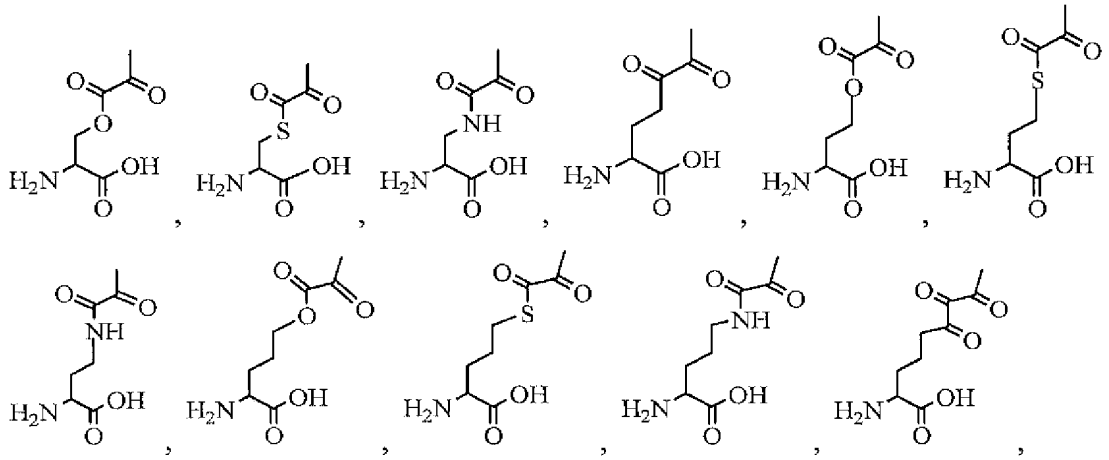
or the –A-B-K-R groups together form a bicyclic or tricyclic cycloalkyl or heterocycloalkyl comprising at least one carbonyl group, including a dicarbonyl group, protected carbonyl group, including a protected dicarbonyl group, or masked carbonyl group, including a masked dicarbonyl group;

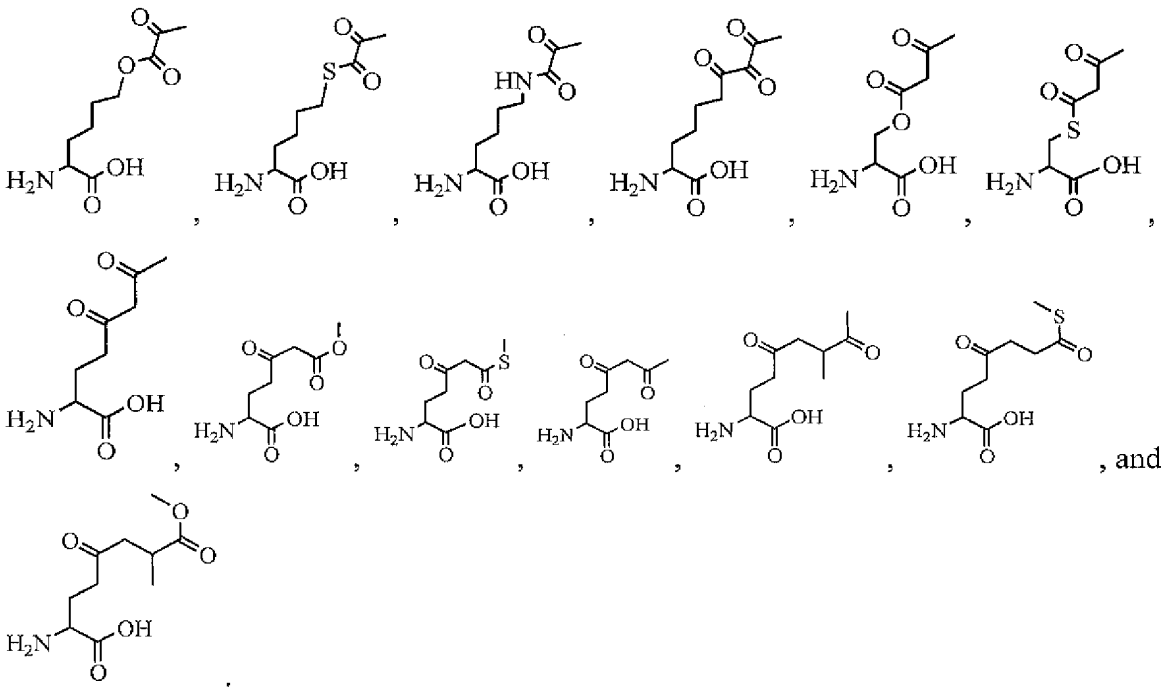
or the –K-R group together forms a monocyclic or bicyclic cycloalkyl or heterocycloalkyl comprising at least one carbonyl group, including a dicarbonyl group, protected carbonyl group, including a protected dicarbonyl group, or masked carbonyl group, including a masked dicarbonyl group.

[302] Non-limiting example of dicarbonyl amino acids having the structure of Formula (XXXVII) include:

[303] 

[304] The following amino acids having structures of Formula (XXXVII) are also included:

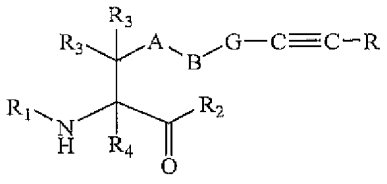




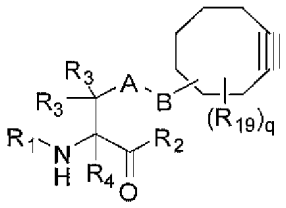
Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

C. ***Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Ketoalkyne, Ketoalkyne -like, Masked Ketoalkyne, Protected Ketoalkyne Groupk, Alkyne, and Cycloalkyne Groups***

[305] Amino acids containing reactive groups with dicarbonyl-like reactivity allow for the linking of molecules via nucleophilic addition reactions. Such electrophilic reactive groups include a ketoalkyne group, a ketoalkyne-like group (which has reactivity similar to a ketoalkyne group and is structurally similar to a ketoalkyne group), a masked ketoalkyne group (which can be readily converted into a ketoalkyne group), or a protected ketoalkyne group (which has reactivity similar to a ketoalkyne group upon deprotection). In some embodiments, amino acids containing reactive groups with a terminal alkyne, internal alkyne or cycloalkyne allow for linking of molecules via cycloaddition reactions (e.g., 1,3-dipolar cycloadditions, azide-alkyne Huisgen cycloaddition, etc.) Such amino acids include amino acids having the structure of Formula (XXXXXXXI-A) or (XXXXXXXI-B):



(XXXXXXI-A),

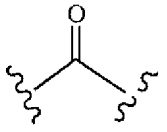
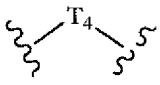


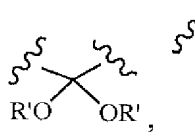
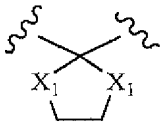
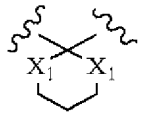
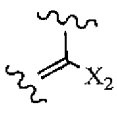
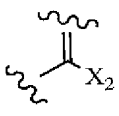
(XXXXXXI-B),

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker linked at one end to a diamine containing moiety, the linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)R"-, -S(O)$_k$(alkylene or substituted alkylene)-, where k is 1, 2, or 3, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -NR"-(alkylene or substituted alkylene)-, -CON(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, and -N(R")CO-(alkylene or substituted alkylene)-, where each R" is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

G is optional, and when present is  , or  ;

T_4 is a carbonyl protecting group including, but not limited to,  ,  ,  ;  ; or  , where each X_1 is independently selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(H)-, -N(R)-, -N(Ac)-, and -N(OMe)-; X_2 is -OR, -OAc, -SR, -N(R)$_2$, -N(R)(Ac), -N(R)(OMe), or N_3, and where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

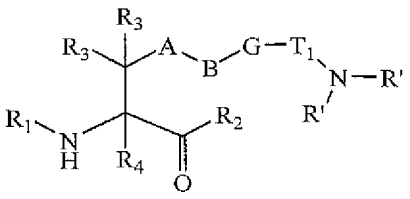
each of R_3 and R_4 is independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

each R_{19} is independently selected from the group consisting of C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, ester, ether, thioether, aminoalkyl, halogen, alkyl ester, aryl ester, amide, aryl amide, alkyl halide, alkyl amine, alkyl sulfonic acid, alkyl nitro, thioester, sulfonyl ester, halosulfonyl, nitrile, alkyl nitrile, and nitro; and

q is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11.

D. Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Ketoamine, Ketoamine-like, Masked Ketoamine, and Protected Ketoamine Groups

[306] Amino acids containing reactive groups with dicarbonyl-like reactivity allow for the linking of molecules via nucleophilic addition reactions. Such reactive groups include a ketoamine group, a ketoamine-like group (which has reactivity similar to a ketoamine group and is structurally similar to a ketoamine group), a masked ketoamine group (which can be readily converted into a ketoamine group), or a protected ketoamine group (which has reactivity similar to a ketoamine group upon deprotection). Such amino acids include amino acids having the structure of Formula (XXXXXXII):



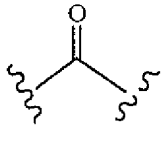
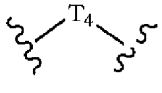
(XXXXXXII)

wherein:

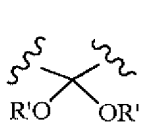
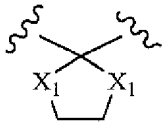
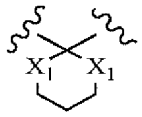
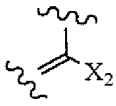
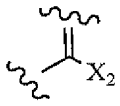
A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker linked at one end to a diamine containing moiety, the linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene,

substituted lower heteroalkylene, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)R"-, -S(O)$_k$(alkylene or substituted alkylene)-, where k is 1, 2, or 3, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -NR"-(alkylene or substituted alkylene)-, -CON(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, and -N(R")CO-(alkylene or substituted alkylene)-, where each R" is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

G is  , or  ;

T_1 is an optionally substituted C_1-C_4 alkylene, an optionally substituted C_1-C_4 alkenylene, or an optionally substituted heteroalkyl;

T_4 is a carbonyl protecting group including, but not limited to,  ,  ,  ;  ; or  , where each X_1 is independently selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(H)-, -N(R')-, -N(Ac)-, and –N(OMe)-; X_2 is –OR, -OAc, -SR', -N(R')$_2$, -N(R')(Ac), -N(R')(OMe), or N_3, and where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

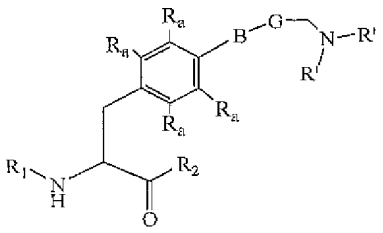
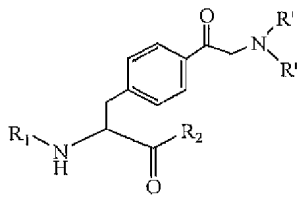
R is H, halogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each of R_3 and R_4 is independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl.

[307] Amino acids having the structure of Formula (XXXXXXII) include amino acids having the structure of Formula (XXXXXXIII) and Formula (XXXXXXIV):

 (XXXXXXIII),  (XXXXXXIV)

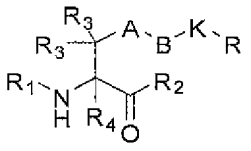
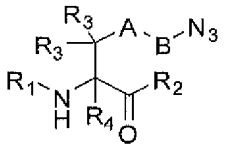
wherein each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ where k is 1, 2, or 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl.

E. Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Diamine, Diamine-like, Masked Diamine, Protected Amines and Azides

[308] Amino acids with a nucleophilic reactive group allow for a variety of reactions to link molecules via electrophilic addition reactions among others. Such nucleophilic reactive groups include a diamine group (including a hydrazine group, an amidine group, an imine group, a 1,1-diamine group, a 1,2-diamine group, a 1,3-diamine group, and a 1,4-diamine group), a diamine-like group (which has reactivity similar to a diamine group and is structurally similar to a diamine group), a masked diamine group (which can be readily converted into a diamine group), or a protected diamine group (which has reactivity similar to a diamine group upon deprotection). In some embodiments, amino acids containing reactive groups with azides allow for linking of molecules via cycloaddition reactions (e.g., 1,3-dipolar cycloadditions, azide-alkyne Huisgen cycloaddition, etc.).

[309] In another aspect are methods for the chemical synthesis of hydrazine-substituted molecules for the derivatization of carbonyl-substituted NRL derivatives. In one embodiment, the hydrazine-substituted molecule can NRL linked derivatives. In one embodiment are methods for the preparation of hydrazine-substituted molecules suitable for the derivatization of carbonyl-containing non-natural amino acid polypeptides, including by way of example only, ketone-, or aldehyde-containing non-natural amino acid polypeptides. In a further or additional embodiment, the non-natural amino acids are incorporated site-specifically during the in vivo translation of proteins. In a further or additional embodiment, the hydrazine-substituted NRL derivatives allow for the site-specific derivatization of carbonyl-containing non-natural amino acids via nucleophilic attack of each carbonyl group to form a heterocycle-derivatized polypeptide, including a nitrogen-containing heterocycle-derivatized polypeptide in a site-specific fashion. In a further or additional embodiment, the method for the preparation of hydrazine-substituted NRL derivatives provides access to a wide variety of site-specifically derivatized polypeptides. In a further or additional embodiment are methods for synthesizing hydrazine-functionalized polyethyleneglycol (PEG) linked NRL derivatives.

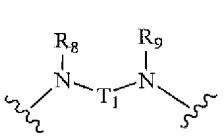
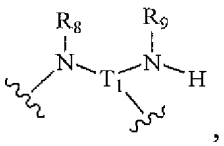
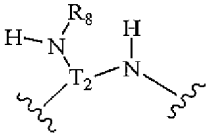
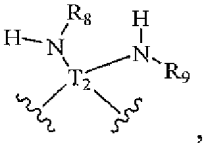
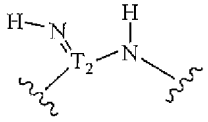
[310] Such amino acids include amino acids having the structure of Formula (XXXVII-A) or (XXXVII-B):


(XXXVII),

(XXXVII-B),

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker linked at one end to a diamine containing moiety, the linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)R"-, -C(O)R"-, -S(O)$_k$(alkylene or substituted alkylene)-, where k is 1, 2, or 3, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -NR"-(alkylene or substituted alkylene)-, -CON(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, and -N(R")CO-(alkylene or substituted alkylene)-, where each R" is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

K is  ,  ,  ,  , or  ;where:

R_8 and R_9 are independently selected from H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, or amine protecting group;

T_1 is a bond, optionally substituted C_1-C_4 alkylene, optionally substituted C_1-C_4 alkenylene, or optionally substituted heteroalkyl;

T_2 is optionally substituted C_1-C_4 alkylene, optionally substituted C_1-C_4 alkenylene, optionally substituted heteroalkyl, optionally substituted aryl, or optionally substituted heteroaryl;

wherein each optional substituents is independently selected from lower alkyl, substituted lower alkyl, lower cycloalkyl, substituted lower cycloalkyl, lower alkenyl, substituted lower alkenyl, alkynyl, lower heteroalkyl, substituted heteroalkyl, lower heterocycloalkyl, substituted lower heterocycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, alkaryl, substituted alkaryl, aralkyl, or substituted aralkyl;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each of R_3 and R_4 is independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

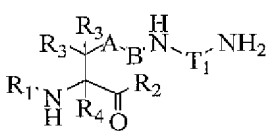
or the –A-B-K-R groups together form a bicyclic or tricyclic cycloalkyl or heterocycloalkyl comprising at least one diamine group, protected diamine group or masked diamine group;

or the –B-K-R groups together form a bicyclic or tricyclic cycloalkyl or cycloaryl or heterocycloalkyl comprising at least one diamine group, protected diamine group or masked diamine group;

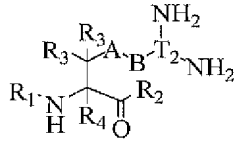
or the –K-R group together forms a monocyclic or bicyclic cycloalkyl or heterocycloalkyl comprising at least one diamine group, protected diamine group or masked diamine group;

wherein at least one amine group on –A-B-K-R is optionally a protected amine.

[311] In one aspect are compounds comprising the structures **1** or **2**:



1



2

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker linked at one end to a diamine containing moiety, the linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)R"-,-$S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, where k is 1, 2, or 3, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -NR"-(alkylene or substituted alkylene)-, -CON(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R")-(alkylene or substituted alkylene)-, and -N(R")CO-(alkylene or substituted alkylene)-, where each R" is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

T_1 is a bond or CH_2; and T_2 is CH;

wherein each optional substituents is independently selected from lower alkyl, substituted lower alkyl, lower cycloalkyl, substituted lower cycloalkyl, lower alkenyl, substituted lower alkenyl, alkynyl, lower heteroalkyl, substituted heteroalkyl, lower heterocycloalkyl, substituted lower heterocycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, alkaryl, substituted alkaryl, aralkyl, or substituted aralkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each of R_3 and R_4 is independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

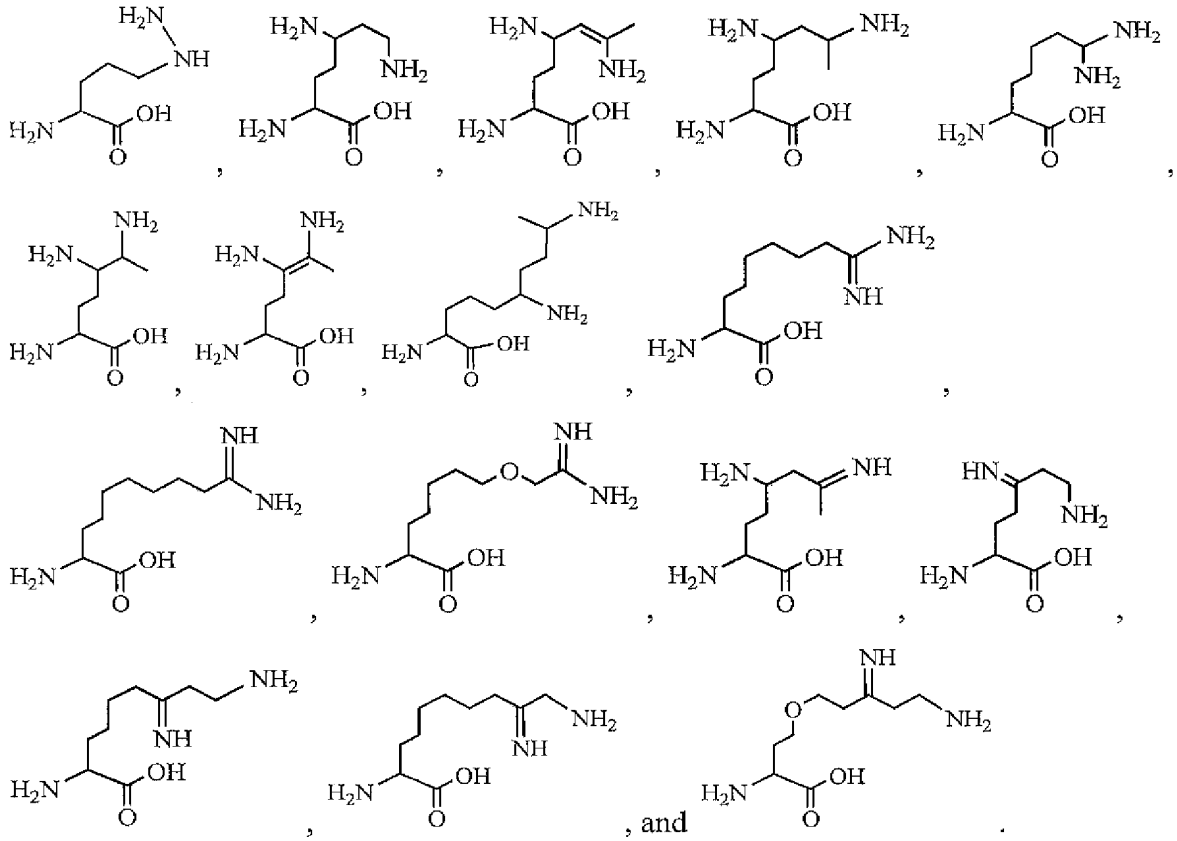
or the –A-B-diamine containing moiety together form a bicyclic cycloalkyl or heterocycloalkyl comprising at least one diamine group, protected diamine group or masked diamine group;

or the –B-diamine containing moiety groups together form a bicyclic or tricyclic cycloalkyl or cycloaryl or heterocycloalkyl comprising at least one diamine group, protected diamine group or masked diamine group;

wherein at least one amine group on –A-B-diamine containing moiety is optionally a protected amine;

or an active metabolite, salt, or a pharmaceutically acceptable prodrug or solvate thereof.

[312] The following non-limiting examples of amino acids having the structure of Formula (XXXVII) are included:



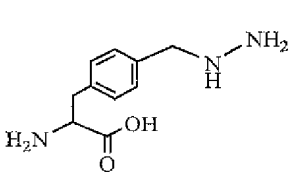
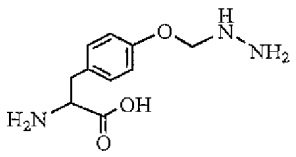
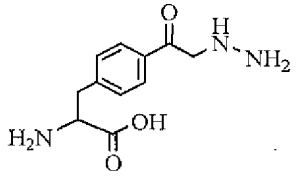
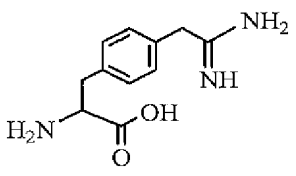
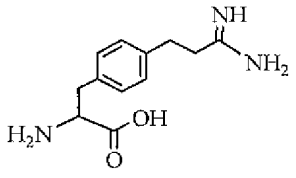
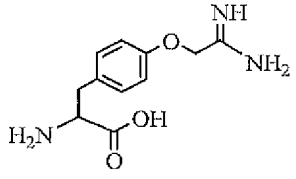
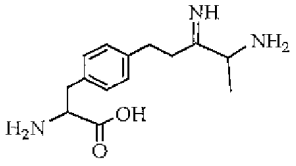
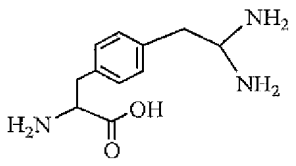
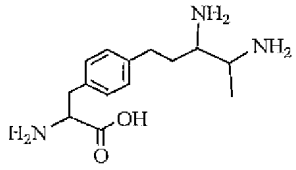
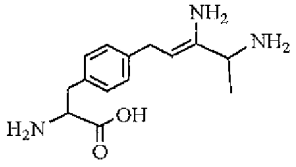
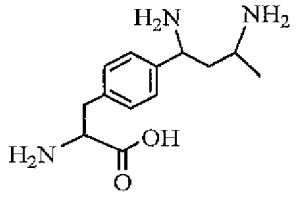
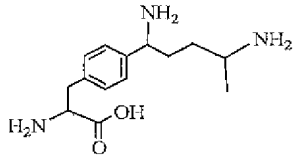
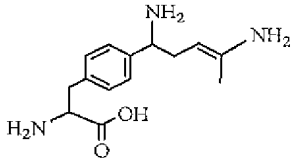
Such non-natural amino acids may also be in the form of a salt or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and/or optionally post translationally modified.

[313] In certain embodiments, compounds of Formula (XXXVII) are stable in aqueous solution for at least 1 month under mildly acidic conditions. In certain embodiments, compounds of Formula (XXXVII) are stable for at least 2 weeks under mildly acidic conditions. In certain embodiments, compound of Formula (XXXVII) are stable for at least 5 days under mildly acidic conditions. In certain embodiments, such acidic conditions are pH about 2 to about 8.

[314] In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), B is lower alkylene, substituted lower alkylene, O-(alkylene or substituted alkylene)-, C(R')=NN(R')-, -N(R')CO-, C(O)-, -C(R')=N-, C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, CON(R')(alkylene or substituted alkylene)-, -S(alkylene or substituted alkylene)-, -S(O)(alkylene or substituted alkylene)-, or -$S(O)_2$(alkylene or substituted alkylene)-. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), B is –$O(CH_2)$-, -CH=N-, CH=NNH-, -$NHCH_2$-, -NHCO-, C(O)-, $C(O)(CH_2)$-, $CONH(CH_2)$-, -SCH_2-, -$S(=O)CH_2$-, or -$S(O)_2CH_2$-. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R is C_{1-6} alkyl or cycloalkyl. In certain

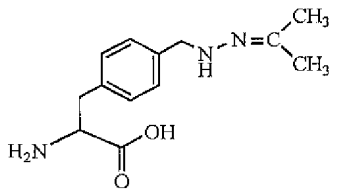
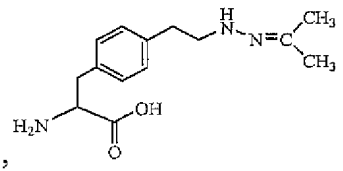
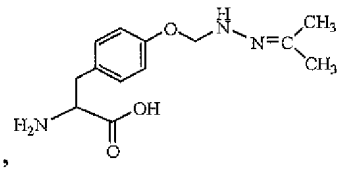
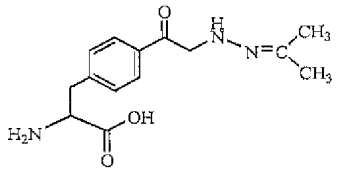
embodiments of compounds of Formula (XXXVII) R is –CH_3, -$CH(CH3)_2$, or cyclopropyl. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R_1 is H, tert-butyloxycarbonyl (Boc), 9- Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), N-acetyl, tetrafluoroacetyl (TFA), or benzyloxycarbonyl (Cbz). In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R_1 is a resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R_1 is an αPSMA antibody, antibody fragment or monoclonal antibody. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R_2 is OH, O-methyl, O-ethyl, or O-t-butyl. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R_2 is a resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide. In certain embodiments of compounds of Formula (XXXVII), R_2 is an αPSMA antibody, antibody fragment or monoclonal antibody.

[315] The following non-limiting examples of amino acids having the structure of Formula (XXXVII) are also included:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

, and

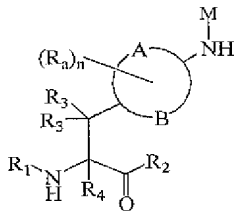
.

[316] Non-limiting examples of protected amino acids having the structure of Formula (XXXVII) include:

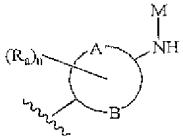

,

,

,and

.

F. *Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Aromatic Amines*

[317] Non-natural amino acids with nucleophilic reactive groups, such as, by way of example only, an aromatic amine group (including secondary and tertiary amine groups), a masked aromatic amine group (which can be readily converted into a aromatic amine group), or a protected aromatic amine group (which has reactivity similar to an aromatic amine group upon deprotection) allow for a variety of reactions to link molecules via various reactions, including but not limited to, reductive alkylation reactions with aldehyde containing NRL conjugates. Such aromatic amine containing non-natural amino acids include amino acids having the structure of Formula (XXXXXXV):


(XXXXXXV)

wherein:


is selected from the group consisting of a monocyclic aryl ring, a bicyclic aryl ring, a multicyclic aryl ring, a monocyclic heteroaryl ring, a bicyclic heteroaryl ring, and a multicyclic heteroaryl ring;

A is independently CR_a, or N;

B is independently CR_a, N, O, or S;

each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, $-NO_2$, -CN, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where k is 1, 2, or 3; and n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, or 6;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide; and

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

each of R_3 and R_4 is independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

M is H or $-CH_2R_5$; or the M-N-C(R_5) moiety may form a 4 to 7 membered ring structure;

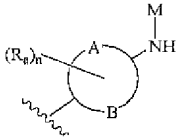
R_5 is alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, alkoxy, substituted alkoxy, alkylalkoxy, substituted alkylalkoxy, polyalkylene oxide, substituted polyalkylene oxide, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocycle, substituted heterocycle, alkaryl, substituted alkaryl, aralkyl, substituted aralkyl, -C(O)R", -C(O)OR", $-C(O)N(R")_2$, $-C(O)NHCH(R")_2$, -(alkylene or substituted alkylene)-$N(R")_2$, -(alkenylene or substituted alkenylene)-$N(R")_2$, -(alkylene or substituted alkylene)-(aryl or substituted aryl), -(alkenylene or substituted alkenylene)-(aryl or substituted aryl), -(alkylene or substituted alkylene)-$ON(R")_2$, -(alkylene or substituted alkylene)-C(O)SR", -(alkylene or substituted alkylene)-S-S-(aryl or substituted aryl), wherein each R" is independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkoxy, substituted alkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocycle, substituted heterocycle, alkaryl, substituted alkaryl, aralkyl, substituted aralkyl, or -C(O)OR';

or two R_5 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

or R_5 and any R_a optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl; and

each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl.

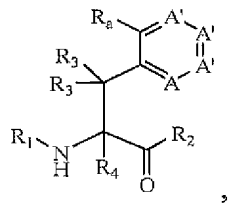
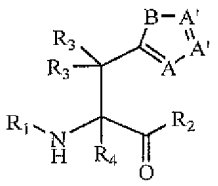
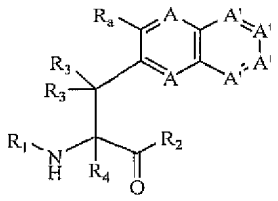
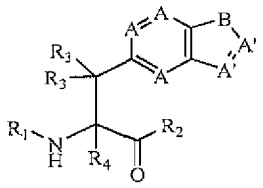
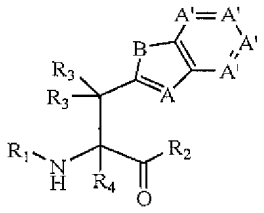
Such non-natural amino acids may also be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally reductively alkylated.



The structure (as presented in all examples herein) does not present the relative orientations of "A," "B," "NH-M" and "R_a"; rather these four features of this

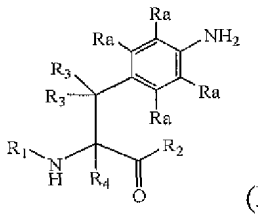
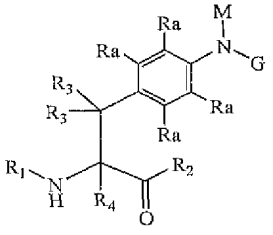
structure may be oriented in any chemically-sound manner (along with other features of this structure), as illustrated by example herein.

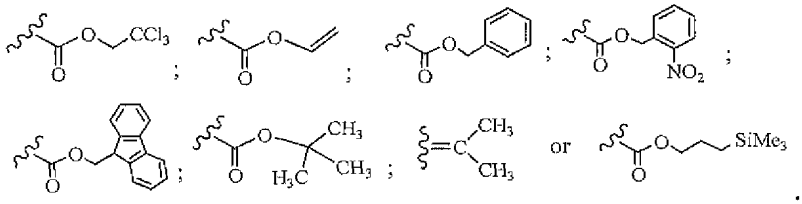
[318] Non-natural amino acids containing an aromatic amine moiety having the structure of Formula (A) include non-natural amino acids having the structures:


,

,

,

, and

; wherein, each A' is independently selected from CR_a, N, or $C{-}\overset{M}{\underset{|}{N}}H$, and up to two A' may be $C{-}\overset{M}{\underset{|}{N}}H$ with the remaining A' selected from CR_a, or N.

Such non-natural amino acids may also be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally reductively alkylated.

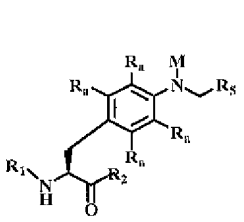
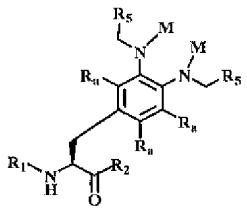
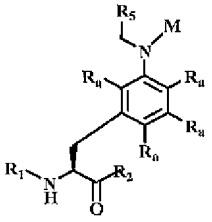
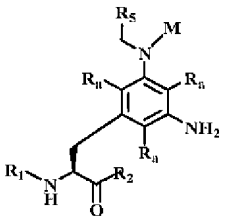
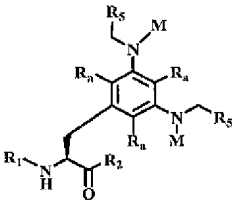
[319] Non-limiting examples of non-natural amino acids containing an aromatic amine moiety having the structure of Formula (XXXXXXV) include non-natural amino acids having the structure of Formula (XXXXXXVI), and Formula (XXXXXXVII),


(XXXXXXVI),

(XXXXXXVII), wherein; G is an amine protecting group, including, but not limited to,



Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally reductively alkylated.

[320] Non-natural amino acids containing an aromatic amine moiety have the following structures:


,

,

,

, and

;

wherein each R_a is independently selected from the group consisting of H, halogen, alkyl, $-NO_2$, -CN, substituted alkyl, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$, $-C(O)N(R')_2$, -OR', and $-S(O)_kR'$, where k is 1, 2, or 3;

M is H or $-CH_2R_5$; or the M-N-C(R_5) moiety may form a 4 to 7 membered ring structure;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_5 is alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, alkoxy, substituted alkoxy, alkylalkoxy, substituted alkylalkoxy, polyalkylene oxide, substituted polyalkylene oxide, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocycle, substituted heterocycle, alkaryl, substituted alkaryl, aralkyl, substituted aralkyl, -C(O)R", -C(O)OR", $-C(O)N(R")_2$, $-C(O)NHCH(R")_2$, -(alkylene or substituted alkylene)-$N(R")_2$, -(alkenylene or substituted alkenylene)-$N(R")_2$, -(alkylene or substituted alkylene)-(aryl or substituted aryl), -(alkenylene or substituted alkenylene)-(aryl or substituted aryl), -(alkylene or substituted alkylene)-$ON(R")_2$, -(alkylene or substituted alkylene)-C(O)SR", -(alkylene or substituted alkylene)-S-S-(aryl or substituted aryl), wherein each R" is independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkoxy, substituted alkoxy, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocycle, substituted heterocycle, alkaryl, substituted alkaryl, aralkyl, substituted aralkyl, or -C(O)OR';

or R_5 and any R_a optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl; and

each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl. Such non-natural amino acids may also be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide.

[321] Such non-natural amino acids of Formula (XXXXXXV) may be formed by reduction of protected or masked amine moieties on the aromatic moiety of a non-natural amino acid. Such protected or masked amine moieties include, but are not limited to, imines, hydrazines, nitro, or azide substituents. The reducing agents used to reduce such protected or masked amine moieties include, but are not limited to, TCEP, Na_2S, $Na_2S_2O_4$, $LiAlH_4$, $NaBH_4$ or $NaBCNH_3$.

II. Non-Natural Amino Acid Linked Nuclear Receptor Ligand Conjugates

[322] In another aspect described herein are methods, strategies and techniques for incorporating at least one such NRL conjugate into a non-natural amino acid. Also included with this aspect are methods for producing, purifying, characterizing and using such NRL conjugates containing at least one such non-natural amino acid. Also included with this aspect are compositions of and methods for producing, purifying, characterizing and using oligonucleotides (including DNA and RNA) that can be used to produce, at least in part, a NRL conjugate containing at least one non-natural amino acid. Also included with this aspect are compositions of and methods for producing, purifying, characterizing and using cells that can express such oligonucleotides that can be used to produce, at least in part, a nuclear receptor ligand linker derivative containing at least one non-natural amino acid.

[323] Thus, nuclear receptor ligand linker derivatives comprising at least one non-natural amino acid or modified non-natural amino acid with a carbonyl, dicarbonyl, alkyne, cycloalkyne, azide, oxime or hydroxylamine group are provided and described herein. In certain embodiments, NRL conjugates with at least one non-natural amino acid or modified non-natural amino acid with a carbonyl, dicarbonyl, alkyne, cycloalkyne, azide, oxime or hydroxylamine group include at least one post-translational modification at some position on the polypeptide. In some embodiments the co-translational or post-translational modification occurs via the cellular machinery (e.g., glycosylation, acetylation, acylation, lipid-modification, palmitoylation, palmitate addition, phosphorylation, glycolipid-linkage modification, and the like), in many instances, such cellular-machinery-based co-translational or post-translational modifications occur at the naturally occurring amino acid sites on the polypeptide, however, in certain embodiments, the cellular-machinery-based co-translational

or post-translational modifications occur on the non-natural amino acid site(s) on the polypeptide.

[324] In other embodiments, the post-translational modification does not utilize the cellular machinery, but the functionality is instead provided by attachment of a molecule (a polymer; a water-soluble polymer; a derivative of polyethylene glycol; a second protein or polypeptide or polypeptide analog; an antibody or antibody fragment; and any combination thereof) comprising a second reactive group to the at least one non-natural amino acid comprising a first reactive group (including but not limited to, non-natural amino acid containing a ketone, aldehyde, acetal, hemiacetal, alkyne, cycloalkyne, azide, oxime, or hydroxylamine functional group) utilizing chemistry methodology described herein, or others suitable for the particular reactive groups. In certain embodiments, the co-translational or post-translational modification is made *in vivo* in a eukaryotic cell or in a non-eukaryotic cell. In certain embodiments, the post-translational modification is made *in vitro* not utilizing the cellular machinery. Also included with this aspect are methods for producing, purifying, characterizing and using such NRL conjugates containing at least one such co-translationally or post-translationally modified non-natural amino acids.

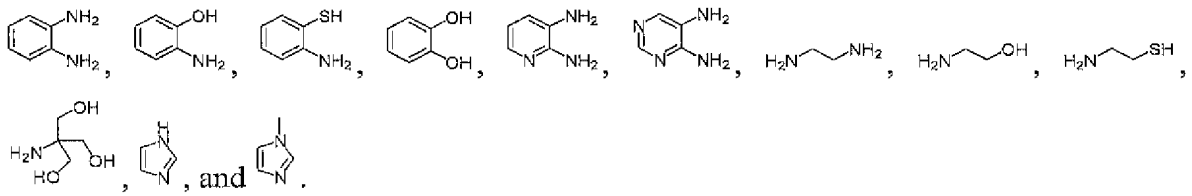
[325] Also included within the scope of the methods, compositions, strategies and techniques described herein are reagents capable of reacting with a NRL conjugate (containing a carbonyl or dicarbonyl group, oxime group, alkyne, cycloalkyne, azide, hydroxylamine group, or masked or protected forms thereof) that is part of a polypeptide so as to produce any of the aforementioned post-translational modifications. In certain embodiments, the resulting post-translationally modified NRL conjugate will contain at least one oxime group; the resulting modified oxime-containing NRL linker derivative may undergo subsequent modification reactions. Also included with this aspect are methods for producing, purifying, characterizing and using such reagents that are capable of any such post-translational modifications of such NRL linker derivative(s).

[326] In certain embodiments, the polypeptide or non-natural amino acid linked NRL derivative includes at least one co-translational or post-translational modification that is made *in vivo* by one host cell, where the post-translational modification is not normally made by another host cell type. In certain embodiments, the polypeptide includes at least one co-translational or post-translational modification that is made *in vivo* by a eukaryotic cell, where the co-translational or post-translational modification is not normally made by a non-eukaryotic cell. Examples of such co-translational or post-translational modifications include,

but are not limited to, glycosylation, acetylation, acylation, lipid-modification, palmitoylation, palmitate addition, phosphorylation, glycolipid-linkage modification, and the like. In one embodiment, the co-translational or post-translational modification comprises attachment of an oligosaccharide to an asparagine by a GlcNAc-asparagine linkage (including but not limited to, where the oligosaccharide comprises $(GlcNAc\text{-}Man)_2$-Man-GlcNAc-GlcNAc, and the like). In another embodiment, the co-translational or post-translational modification comprises attachment of an oligosaccharide (including but not limited to, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) to a serine or threonine by a GalNAc-serine, a GalNAc-threonine, a GlcNAc-serine, or a GlcNAc-threonine linkage. In certain embodiments, a protein or polypeptide can comprise a secretion or localization sequence, an epitope tag, a FLAG tag, a polyhistidine tag, a GST fusion, and/or the like. Also included with this aspect are methods for producing, purifying, characterizing and using such polypeptides containing at least one such co-translational or post-translational modification. In other embodiments, the glycosylated non-natural amino acid polypeptide is produced in a non-glycosylated form. Such a non-glycosylated form of a glycosylated non-natural amino acid may be produced by methods that include chemical or enzymatic removal of oligosaccharide groups from an isolated or substantially purified or unpurified glycosylated non-natural amino acid polypeptide; production of the non-natural amino acid in a host that does not glycosylate such a non-natural amino acid polypeptide (such a host including, prokaryotes or eukaryotes engineered or mutated to not glycosylate such a polypeptide), the introduction of a glycosylation inhibitor into the cell culture medium in which such a non-natural amino acid polypeptide is being produced by a eukaryote that normally would glycosylate such a polypeptide, or a combination of any such methods. Also described herein are such non-glycosylated forms of normally-glycosylated non-natural amino acid polypeptides (by normally-glycosylated is meant a polypeptide that would be glycosylated when produced under conditions in which naturally-occurring polypeptides are glycosylated). Of course, such non-glycosylated forms of normally-glycosylated non-natural amino acid polypeptides (or indeed any polypeptide described herein) may be in an unpurified form, a substantially purified form, or in an isolated form.

[327] In certain embodiments, the non-natural amino acid polypeptide includes at least one post-translational modification that is made in the presence of an accelerant, wherein the post-translational modification is stoichiometric, stoichiometric-like, or near-stoichiometric. In other embodiments the polypeptide is contacted with a reagent of Formula (XIX) in the

presence of an accelerant. In other embodiments the accelerant is selected from the group consisting of:

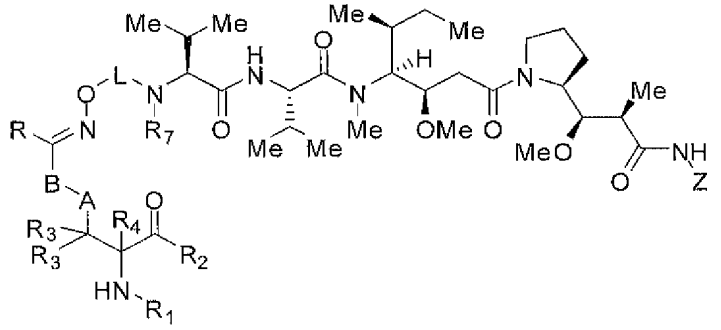


Chemical Synthesis of Non-Natural Amino Acid Linked Nuclear Receptor Ligand Derivatives: Oxime-Containing Linked Nuclear Receptor Ligand Derivatives

[328] Non-natural amino acid NRL linked derivatives containing an oxime group allow for reaction with a variety of reagents that contain certain reactive carbonyl- or dicarbonyl-groups (including but not limited to, ketones, aldehydes, or other groups with similar reactivity) to form new non-natural amino acids comprising a new oxime group. Such an oxime exchange reaction allows for the further functionalization of NRL linked derivatives. Further, the original NRL linked derivative containing an oxime group may be useful in their own right as long as the oxime linkage is stable under conditions necessary to incorporate the amino acid into a polypeptide (e.g., the *in vivo*, *in vitro* and chemical synthetic methods described herein).

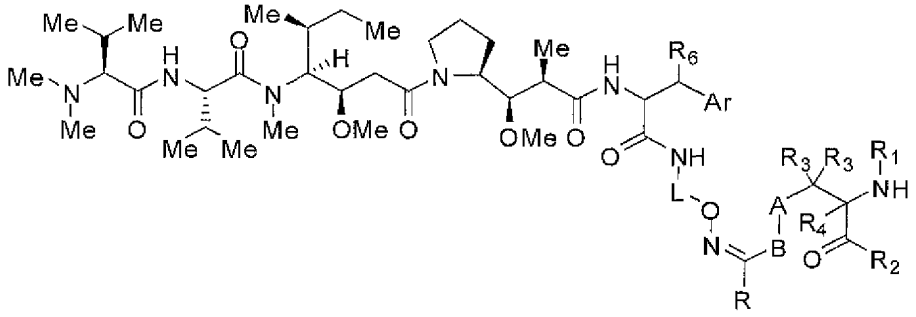
[329] Thus, in certain embodiments described herein are non-natural amino acid NRL linked derivatives with sidechains comprising an oxime group, an oxime-like group (which has reactivity similar to an oxime group and is structurally similar to an oxime group), a masked oxime group (which can be readily converted into an oxime group), or a protected oxime group (which has reactivity similar to an oxime group upon deprotection).

[330] Such non-natural amino acid NRL linked derivatives include NRL linked derivatives having the structure of Formula (VIII) or (IX) wherein NRL is any nuclear receptor ligand:



(VIII)

;



(IX)

;

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, $-S(O)_k-$ where k is 1, 2, or 3, $-S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, and $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

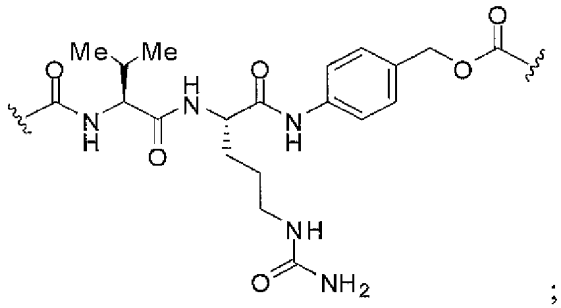
R_1 is H, an amino protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_3 and R_4 are each independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

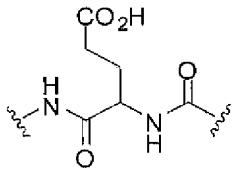
L is a linker selected from the group consisting of –alkylene–, –alkylene–C(O)–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–C(O)–, –(alkylene–O)$_n$–(CH$_2$)$_{n'}$–NHC(O)–(CH$_2$)$_{n''}$–C(Me)$_2$–S–S–(CH$_2$)$_{n'''}$–NHC(O)–(alkylene–O)$_{n''''}$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–W–, –alkylene–C(O)–W–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–U–alkylene–C(O)–, and –(alkylene–O)$_n$–alkylene–U–alkylene–;

W has the structure of:



;

U has the structure of:



; and

each n, n', n'', n''' and n'''' are independently integers greater than or equal to one;

or an active metabolite, or a pharmaceutically acceptable prodrug or solvate thereof.

[331] In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), n is an integer from 0 to 20. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), n is an integer from 0 to 10. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), n is an integer from 0 to 5. In certain embodiments of Formula (VIII) and (IX), alkylene is methylene, ethylene, propylene, butylenes, pentylene, hexylene, or heptylene.

[332] In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), each L is independently a cleavable linker or non-cleavable linker. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), each L is independently a oligo(ethylene glycol) derivatized linker.

[333] In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), each alkylene, alkylene', alkylene'', and alkylene''' independently is –CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$–, –

$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$–, or –$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$–. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), alkylene is methylene, ethylene, propylene, butylenes, pentylene, hexylene, or heptylene.

[334] In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) and (IX), each n, n', n", n"', and n"" independently is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, or 100.

[335] In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), R_1 is a polypeptide. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), R_2 is a polypeptide. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), the polypeptide is an αPSMA antibody.

[336] In certain embodiments, compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII) are stable in aqueous solution for at least 1 month under mildly acidic conditions. In certain embodiments, compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII) are stable for at least 2 weeks under mildly acidic conditions. In certain embodiments, compound of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII) are stable for at least 5 days under mildly acidic conditions. In certain embodiments, such acidic conditions are pH 2 to 8. Such non-natural amino acids may be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[337] Oxime-based non-natural amino acids may be synthesized by methods already described in the art, or by methods described herein, including: (a) reaction of a hydroxylamine-containing non-natural amino acid with a carbonyl- or dicarbonyl-containing reagent; (b) reaction of a carbonyl- or dicarbonyl-containing non-natural amino acid with a hydroxylamine-containing reagent; or (c) reaction of an oxime-containing non-natural amino acid with certain carbonyl- or dicarbonyl-containing reagents.

[338] ***Chemical Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acid Linked Nuclear Receptor Ligand Derivatives: Alkylated Aromatic Amine Linked Nuclear Receptor Ligand Derivatives***

[339] In one aspect are NRL linker derivatives for the chemical derivatization of non-natural amino acids based upon the reactivity of an aromatic amine group. In further or

additional embodiments, at least one of the aforementioned non-natural amino acids is incorporated into an NRL linker derivative, that is, such embodiments are non-natural amino acid linked NRL derivatives. In further or additional embodiments, the NRL linker derivatives are functionalized on their sidechains such that their reaction with a derivatizing non-natural amino acid generates an amine linkage. In further or additional embodiments, the NRL linker derivatives are selected from NRL linker derivatives having aromatic amine sidechains. In further or additional embodiments, the NRL linker derivatives comprise a masked sidechain, including a masked aromatic amine group. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are selected from amino acids having aromatic amine sidechains. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids comprise a masked sidechain, including a masked aromatic amine group.

[340] In another aspect are carbonyl-substituted NRL linker derivatives such as, by way of example, aldehydes, and ketones, for the production of derivatized non-natural amino acid polypeptides based upon an amine linkage. In a further embodiment are aldehyde-substituted NRL linker derivatives used to derivatize aromatic amine-containing non-natural amino acid polypeptides via the formation of an amine linkage between the derivatizing NRL linker and the aromatic amine-containing non-natural amino acid polypeptide.

[341] In further or additional embodiments, the non-natural amino acids comprise aromatic amine sidechains where the aromatic amine is selected from an aryl amine or a heteroaryl amine. In a further or additional embodiment, the non-natural amino acids resemble a natural amino acid in structure but contain aromatic amine groups. In another or further embodiment the non-natural amino acids resemble phenylalanine or tyrosine (aromatic amino acids). In one embodiment, the non-natural amino acids have properties that are distinct from those of the natural amino acids. In one embodiment, such distinct properties are the chemical reactivity of the sidechain; in a further embodiment this distinct chemical reactivity permits the sidechain of the non-natural amino acid to undergo a reaction while being a unit of a polypeptide even though the sidechains of the naturally-occurring amino acid units in the same polypeptide do not undergo the aforementioned reaction. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid has a chemistry orthogonal to those of the naturally-occurring amino acids. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid comprises a nucleophile-containing moiety; in a further embodiment, the nucleophile-containing moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo a reaction to generate an amine-linked derivatized NRL. In a further embodiment, the sidechain of the

non-natural amino acid comprises an electrophile-containing moiety; in a further embodiment, the electrophile-containing moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo nucleophilic attack to generate an amine-linked derivatized NRL. In any of the aforementioned embodiments in this paragraph, the non-natural amino acid may exist as a separate molecule or may be incorporated into a polypeptide of any length; if the latter, then the polypeptide may further incorporate naturally-occurring or non-natural amino acids.

[342] Modification of non-natural amino acids described herein using reductive alkylation or reductive amination reactions have any or all of the following advantages. First, aromatic amines can be reductively alkylated with carbonyl-containing compounds, including aldehydes, and ketones, in a pH range of about 4 to about 10 (and in certain embodiments in a pH range of about 4 to about 7) to generate substituted amine, including secondary and tertiary amine, linkages. Second, under these reaction conditions the chemistry is selective for non-natural amino acids as the sidechains of naturally occurring amino acids are unreactive. This allows for site-specific derivatization of polypeptides which have incorporated non-natural amino acids containing aromatic amine moieties or protected aldehyde moieties, including, by way of example, recombinant proteins. Such derivatized polypeptides and proteins can thereby be prepared as defined homogeneous products. Third, the mild conditions needed to effect the reaction of an aromatic amine moiety on an amino acid, which has been incorporated into a polypeptide, with an aldehyde-containing reagent generally do not irreversibly destroy the tertiary structure of the polypeptide (excepting, of course, where the purpose of the reaction is to destroy such tertiary structure). Similarly, the mild conditions needed to effect the reaction of an aldehyde moiety on an amino acid, which has been incorporated into a polypeptide and deprotected, with an aromatic amine-containing reagent generally do not irreversibly destroy the tertiary structure of the polypeptide (excepting, of course, where the purpose of the reaction is to destroy such tertiary structure). Fourth, the reaction occurs rapidly at room temperature, which allows the use of many types of polypeptides or reagents that would otherwise be unstable at higher temperatures. Fifth, the reaction occurs readily is aqueous conditions, again allowing use of polypeptides and reagents incompatible (to any extent) with non-aqueous solutions. Six, the reaction occurs readily even when the ratio of polypeptide or amino acid to reagent is stoichiometric, stoichiometric-like, or near-stoichiometric, so that it is unnecessary to add excess reagent or polypeptide to obtain a useful amount of reaction product. Seventh, the resulting amine can be produced regioselectively and/or regiospecifically, depending upon the design of the

amine and carbonyl portions of the reactants. Finally, the reductive alkylation of aromatic amines with aldehyde-containing reagents, and the reductive amination of aldehydes with aromatic amine containing reagents, generates amine, including secondary and tertiary amine, linkages which are stable under biological conditions.

[343] Non-natural amino acids with nucleophilic reactive groups, such as, by way of example only, an aromatic amine group (including secondary and tertiary amine groups), a masked aromatic amine group (which can be readily converted into a aromatic amine group), or a protected aromatic amine group (which has reactivity similar to a aromatic amine group upon deprotection) allow for a variety of reactions to link molecules via various reactions, including but not limited to, reductive alkylation reactions with aldehyde containing NRL linked derivatives.

Chemical Synthesis of Non-Natural Amino Acid Linked Nuclear Receptor Ligand Conjugates: Heteroaryl-Containing Nuclear Receptor Ligand Conjugates

[344] In one aspect are non-natural amino acids for the chemical derivatization of NRL linked derivatives based upon the reactivity of a dicarbonyl group, including a group containing at least one ketone group, and/or at least one aldehyde groups, and/or at least one ester group, and/or at least one carboxylic acid, and/or at least one thioester group, and wherein the dicarbonyl group can be a 1,2-dicarbonyl group, a 1,3-dicarbonyl group, or a 1,4-dicarbonyl group. In further or additional aspects are non-natural amino acids for the chemical derivatization of NRL linked derivatives based upon the reactivity of a diamine group, including a hydrazine group, an amidine group, an imine group, a 1,1-diamine group, a 1,2-diamine group, a 1,3-diamine group, and a 1,4-diamine group. In further or additional embodiments, at least one of the aforementioned non-natural amino acids is incorporated into a NRL linked derivative, that is, such embodiments are non-natural amino acid linked NRL derivatives. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are functionalized on their sidechains such that their reaction with a derivatizing molecule generates a linkage, including a heterocyclic-based linkage, including a nitrogen-containing heterocycle, and/or an aldol-based linkage. In further or additional embodiments are non-natural amino acid polypeptides that can react with a derivatizing NRL linker to generate a non-natural amino acid linked NRL derivatives containing a linkage, including a heterocyclic-based linkage, including a nitrogen-containing heterocycle, and/or an aldol-based linkage. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are selected from amino acids having dicarbonyl and/or diamine sidechains. In further or additional

embodiments, the non-natural amino acids comprise a masked sidechain, including a masked diamine group and/or a masked dicarbonyl group. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids comprise a group selected from: keto-amine (i.e., a group containing both a ketone and an amine); keto-alkyne (i.e., a group containing both a ketone and an alkyne); and an ene-dione (i.e., a group containing a dicarbonyl group and an alkene).

[345] In further or additional embodiments, the non-natural amino acids comprise dicarbonyl sidechains where the carbonyl is selected from a ketone, an aldehyde, a carboxylic acid, or an ester, including a thioester. In another embodiment are non-natural amino acids containing a functional group that is capable of forming a heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, upon treatment with an appropriately functionalized reagent. In a further or additional embodiment, the non-natural amino acids resemble a natural amino acid in structure but contain one of the aforementioned functional groups. In another or further embodiment the non-natural amino acids resemble phenylalanine or tyrosine (aromatic amino acids); while in a separate embodiment, the non-natural amino acids resemble alanine and leucine (hydrophobic amino acids). In one embodiment, the non-natural amino acids have properties that are distinct from those of the natural amino acids. In one embodiment, such distinct properties are the chemical reactivity of the sidechain, in a further embodiment this distinct chemical reactivity permits the sidechain of the non-natural amino acid to undergo a reaction while being a unit of a polypeptide even though the sidechains of the naturally-occurring amino acid units in the same polypeptide do not undergo the aforementioned reaction. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid has a chemistry orthogonal to those of the naturally-occurring amino acids. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid comprises an electrophile-containing moiety; in a further embodiment, the electrophile-containing moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo nucleophilic attack to generate a heterocycle-derivatized protein, including a nitrogen-containing heterocycle-derivatized protein. In any of the aforementioned embodiments in this paragraph, the non-natural amino acid may exist as a separate molecule or may be incorporated into a polypeptide of any length; if the latter, then the polypeptide may further incorporate naturally-occurring or non-natural amino acids.

[346] In another aspect are diamine-substituted molecules, wherein the diamine group is selected from a hydrazine, an amidine, an imine, a 1,1-diamine, a 1,2-diamine, a 1,3-diamine and a 1,4-diamine group, for the production of derivatized non-natural amino acid linked

NRL derivatives based upon a heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, linkage. In a further embodiment are diamine-substituted NRL derivatives used to derivatize dicarbonyl-containing non-natural amino acid polypeptides via the formation of a heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, linkage between the derivatizing molecule and the dicarbonyl-containing non-natural amino acid polypeptide. In further embodiments the aforementioned dicarbonyl-containing non-natural amino acid polypeptides are diketone-containing non-natural amino acid polypeptides. In further or additional embodiments, the dicarbonyl-containing non-natural amino acids comprise sidechains where the carbonyl is selected from a ketone, an aldehyde, a carboxylic acid, or an ester, including a thioester. In further or additional embodiments, the diamine-substituted molecules comprise a group selected from a desired functionality. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid has a chemistry orthogonal to those of the naturally-occurring amino acids that allows the non-natural amino acid to react selectively with the diamine-substituted molecules. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid comprises an electrophile-containing moiety that reacts selectively with the diamine-containing molecule; in a further embodiment, the electrophile-containing moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo nucleophilic attack to generate a heterocycle-derivatized protein, including a nitrogen-containing heterocycle-derivatized protein. In a further aspect related to the embodiments described in this paragraph are the modified non-natural amino acid polypeptides that result from the reaction of the derivatizing molecule with the non-natural amino acid polypeptides. Further embodiments include any further modifications of the already modified non-natural amino acid polypeptides.

[347] In another aspect are dicarbonyl-substituted molecules for the production of derivatized non-natural amino acid polypeptides based upon a heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, linkage. In a further embodiment are dicarbonyl-substituted molecules used to derivatize diamine-containing non-natural amino acid polypeptides via the formation of a heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle group. In a further embodiment are dicarbonyl-substituted molecules that can form such heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle groups with a diamine-containing non-natural amino acid polypeptide in a pH range between about 4 and about 8. In a further embodiment are dicarbonyl-substituted molecules used to derivatize diamine-containing non-natural amino acid polypeptides via the formation of a heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, linkage between the derivatizing molecule and the diamine-containing non-

natural amino acid polypeptides. In a further embodiment the dicarbonyl-substituted molecules are diketone-substitued molecules, in other aspects ketoaldehyde-substituted molecules, in other aspects ketoacid-substituted molecules, in other aspects ketoester-substituted molecules, including ketothioester-substituted molecules. In further embodiments, the dicarbonyl-substituted molecules comprise a group selected from a desired functionality. In further or additional embodiments, the aldehyde-substituted molecules are aldehyde-substituted polyethylene glycol (PEG) molecules. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid has a chemistry orthogonal to those of the naturally-occurring amino acids that allows the non-natural amino acid to react selectively with the carbonyl-substituted molecules. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid comprises a moiety (e.g., diamine group) that reacts selectively with the dicarbonyl-containing molecule; in a further embodiment, the nucleophilic moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo electrophilic attack to generate a heterocyclic-derivatized protein, including a nitrogen-containing heterocycle-derivatized protein. In a further aspect related to the embodiments described in this paragraph are the modified non-natural amino acid polypeptides that result from the reaction of the derivatizing molecule with the non-natural amino acid polypeptides. Further embodiments include any further modifications of the already modified non-natural amino acid polypeptides.

[348] In one aspect are methods to derivatize proteins via the reaction of carbonyl and hydrazine reactants to generate a heterocycle-derivatized protein, including a nitrogen-containing heterocycle-derivatized NRL. Included within this aspect are methods for the derivatization of NRL conjugates based upon the condensation of carbonyl- and hydrazine-containing reactants to generate a heterocycle-derivatized NRL, including a nitrogen-containing heterocycle-derivatized NRL. In additional or further embodiments are methods to derivatize ketone-containing NRLderivatives or aldehyde-containing NRL derivatives with hydrazine-functionalized non-natural amino acids. In yet additional or further aspects, the hydrazine-substituted molecule can include proteins, other polymers, and small molecules.

[349] In another aspect are methods for the chemical synthesis of hydrazine-substituted molecules for the derivatization of carbonyl-substituted NRLconjugates. In one embodiment, the hydrazine-substituted molecule is a NRL conjugate suitable for the derivatization of carbonyl-containing non-natural amino acid polypeptides, including by way of example only, ketone-, or aldehyde-containing non-natural amino acid polypeptides.

[350] In one aspect are non-natural amino acids for the chemical derivatization of NRL analogs based upon a quinoxaline or phenazine linkage. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are functionalized on their sidechains such that their reaction with a derivatizing NRL linker generates a quinoxaline or phenazine linkage. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are selected from amino acids having 1,2-dicarbonyl or 1,2-aryldiamine sidechains. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are selected from amino acids having protected or masked 1,2-dicarbonyl or 1,2-aryldiamine sidechains. Further included are equivalents to 1,2-dicarbonyl sidechains, or protected or masked equivalents to 1,2-dicarbonyl sidechains.

[351] In another aspect are derivatizing molecules for the production of derivatized non-natural amino acid polypeptides based upon quinoxaline or phenazine linkages. In one embodiment are 1,2-dicarbonyl substituted NRL linker derivatives used to derivatize 1,2-aryldiamine containing non-natural amino acid polypeptides to form quinoxaline or phenazine linkages. In another embodiment are 1,2-aryldiamine substituted NRL linker derivatives used to derivatize 1,2-dicarbonyl containing non-natural amino acid polypeptides to form quinoxaline or phenazine linkages. In a further aspect related to the above embodiments are the modified non-natural amino acid polypeptides that result from the reaction of the derivatizing NRL linker with the non-natural amino acid polypeptides. In one embodiment are 1,2-aryldiamine containing non-natural amino acid polypeptides derivatized with 1,2-dicarbonyl substituted NRL linker derivative to form quinoxaline or phenazine linkages. In another embodiment are 1,2-dicarbonyl containing non-natural amino acid polypeptides derivatized with 1,2-aryldiamine substituted NRL linker derivatives to form quinoxaline or phenazine linkages.

[352] Provided herein in certain embodiments are derivatizing molecules for the production of compounds comprising non-natural amino acid polypeptides based upon triazole linkages. In some embodiments, the reaction between the first and second reactive groups can proceed via a dipolarophile reaction. In certain embodiments, the first reactive group can be an azide and the second reactive group can be an alkyne. In further or alternative embodiments, the first reactive group can be an alkyne and the second reactive group can be an azide. In some embodiments, the Huisgen cycloaddition reaction (see, e.g., Huisgen, in 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176) provides for the incorporation of non-naturally encoded amino acids bearing azide and alkyne-containing side chains permits the resultant polypeptides to be modified with extremely high selectivity. In

certain embodiments, both the azide and the alkyne functional groups are inert toward the twenty common amino acids found in naturally-occurring polypeptides. When brought into close proximity, however, the "spring-loaded" nature of the azide and alkyne groups is revealed and they react selectively and efficiently via Huisgen [3 2] cycloaddition reaction to generate the corresponding triazole. See, e.g., Chin et al., Science 301:964-7 (2003); Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 125, 3192-3193 (2003); Chin et al., J. Am. Chem. Soc., 124:9026-9027 (2002). Cycloaddition reaction involving azide or alkyne-containing polypeptides can be carried out at room temperature under aqueous conditions by the addition of Cu(II) (e.g., in the form of a catalytic amount of $CuSO_4$) in the presence of a reducing agent for reducing Cu(II) to Cu(I), in situ, in catalytic amount. See, e.g., Wang et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornoe et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002). Preferred reducing agents include ascorbate, metallic copper, quinine, hydroquinone, vitamin K, glutathione, cysteine, Fe^2, Co^2, and an applied electric potential.

[353] Modification of NRL linked derivatives described herein with such reactions have any or all of the following advantages. First, diamines undergo condensation with dicarbonyl-containing compounds in a pH range of about 5 to about 8 (and in further embodiments in a pH range of about 4 to about 10, in other embodiments in a pH range of about 3 to about 8, in other embodiments in a pH range of about 4 to about 9, and in further embodiments a pH range of about 4 to about 9, in other embodiments a pH of about 4, and in yet another embodiment a pH of about 8) to generate heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, linkages. Under these conditions, the sidechains of the naturally occurring amino acids are unreactive. Second, such selective chemistry makes possible the site-specific derivatization of recombinant proteins: derivatized proteins can now be prepared as defined homogeneous products. Third, the mild conditions needed to effect the reaction of the diamines described herein with the dicarbonyl-containing polypeptides described herein generally do not irreversibly destroy the tertiary structure of the polypeptide (excepting, of course, where the purpose of the reaction is to destroy such tertiary structure). Fourth, the reaction occurs rapidly at room temperature, which allows the use of many types of polypeptides or reagents that would be unstable at higher temperatures. Fifth, the reaction occurs readily is aqueous conditions, again allowing use of polypeptides and reagents incompatible (to any extent) with non-aqueous solutions. Six, the reaction occurs readily even when the ratio of polypeptide or amino acid to reagent is stoichiometric, near stoichiometric,

or stoichiometric-like, so that it is unnecessary to add excess reagent or polypeptide to obtain a useful amount of reaction product. Seventh, the resulting heterocycle can be produced regioselectively and/or regiospecifically, depending upon the design of the diamine and dicarbonyl portions of the reactants. Finally, the condensation of diamines with dicarbonyl-containing molecules generates heterocycle, including a nitrogen-containing heterocycle, linkages which are stable under biological conditions.

[354] ***Location of non-natural amino acids in nuclear receptor ligand linker derivatives***

[355] The methods and compositions described herein include incorporation of one or more non-natural amino acids into a NRL linker derivative. One or more non-natural amino acids may be incorporated at one or more particular positions which do not disrupt activity of the NRL linker derivative. This can be achieved by making "conservative" substitutions, including but not limited to, substituting hydrophobic amino acids with non-natural or natural hydrophobic amino acids, bulky amino acids with non-natural or natural bulky amino acids, hydrophilic amino acids with non-natural or natural hydrophilic amino acids) and/or inserting the non-natural amino acid in a location that is not required for activity.

[356] A variety of biochemical and structural approaches can be employed to select the desired sites for substitution with a non-natural amino acid within the NRL linker derivative. In some embodiments, the non-natural amino acid is linked at the C-terminus of the NRL derivative. In other embodiments, the non-natural amino acid is linked at the N-terminus of the NRL derivative. Any position of the NRL linker derivative is suitable for selection to incorporate a non-natural amino acid, and selection may be based on rational design or by random selection for any or no particular desired purpose. Selection of desired sites may be based on producing a non-natural amino acid polypeptide (which may be further modified or remain unmodified) having any desired property or activity, including but not limited to a receptor binding modulators, receptor activity modulators, modulators of binding to binder partners, binding partner activity modulators, binding partner conformation modulators, dimer or multimer formation, no change to activity or property compared to the native molecule, or manipulating any physical or chemical property of the polypeptide such as solubility, aggregation, or stability. Alternatively, the sites identified as critical to biological activity may also be good candidates for substitution with a non-natural amino acid, again depending on the desired activity sought for the polypeptide. Another alternative would be to simply make serial substitutions in each position on the polypeptide chain with a non-natural amino acid and observe the effect on the activities of the polypeptide. Any means, technique,

or method for selecting a position for substitution with a non-natural amino acid into any polypeptide is suitable for use in the methods, techniques and compositions described herein.

[357] The structure and activity of naturally-occurring mutants of a polypeptide that contain deletions can also be examined to determine regions of the protein that are likely to be tolerant of substitution with a non-natural amino acid. Once residues that are likely to be intolerant to substitution with non-natural amino acids have been eliminated, the impact of proposed substitutions at each of the remaining positions can be examined using methods including, but not limited to, the three-dimensional structure of the relevant polypeptide, and any associated ligands or binding proteins. X-ray crystallographic and NMR structures of many polypeptides are available in the Protein Data Bank, a centralized database containing three-dimensional structural data of large molecules of proteins and nucleic acids, one can be used to identify amino acid positions that can be substituted with non-natural amino acids. In addition, models may be made investigating the secondary and tertiary structure of polypeptides, if three-dimensional structural data is not available. Thus, the identity of amino acid positions that can be substituted with non-natural amino acids can be readily obtained.

[358] Exemplary sites of incorporation of a non-natural amino acid include, but are not limited to, those that are excluded from potential receptor binding regions, or regions for binding to binding proteins or ligands may be fully or partially solvent exposed, have minimal or no hydrogen-bonding interactions with nearby residues, may be minimally exposed to nearby reactive residues, and/or may be in regions that are highly flexible as predicted by the three-dimensional crystal structure of a particular polypeptide with its associated receptor, ligand or binding proteins.

[359] A wide variety of non-natural amino acids can be substituted for, or incorporated into, a given position in a polypeptide. By way of example, a particular non-natural amino acid may be selected for incorporation based on an examination of the three dimensional crystal structure of a polypeptide with its associated ligand, receptor and/or binding proteins, a preference for conservative substitutions

[360] In one embodiment, the methods described herein include incorporating into the NRL linker derivative, where the NRL linker derivative comprises a first reactive group; and contacting the NRL linker derivative with a molecule (including but not limited to a second protein or polypeptide or polypeptide analog; an αPSMA antibody or antibody fragment; and any combination thereof) that comprises a second reactive group. In certain embodiments, the first reactive group is a hydroxylamine moiety and the second reactive group is a carbonyl or

dicarbonyl moiety, whereby an oxime linkage is formed. In certain embodiments, the first reactive group is a carbonyl or dicarbonyl moiety and the second reactive group is a hydroxylamine moiety, whereby an oxime linkage is formed. In certain embodiments, the first reactive group is a carbonyl or dicarbonyl moiety and the second reactive group is an oxime moiety, whereby an oxime exchange reaction occurs. In certain embodiments, the first reactive group is an oxime moiety and the second reactive group is carbonyl or dicarbonyl moiety, whereby an oxime exchange reaction occurs.

[361] In some cases, the NRL linker derivative incorporation(s) will be combined with other additions, substitutions, or deletions within the polypeptide to affect other chemical, physical, pharmacologic and/or biological traits. In some cases, the other additions, substitutions or deletions may increase the stability (including but not limited to, resistance to proteolytic degradation) of the polypeptide or increase affinity of the polypeptide for its appropriate receptor, ligand and/or binding proteins. In some cases, the other additions, substitutions or deletions may increase the solubility (including but not limited to, when expressed in E. coli or other host cells) of the polypeptide. In some embodiments sites are selected for substitution with a naturally encoded or non-natural amino acid in addition to another site for incorporation of a non-natural amino acid for the purpose of increasing the polypeptide solubility following expression in E. coli, or other recombinant host cells. In some embodiments, the polypeptides comprise another addition, substitution, or deletion that modulates affinity for the associated ligand, binding proteins, and/or receptor, modulates (including but not limited to, increases or decreases) receptor dimerization, stabilizes receptor dimers, modulates circulating half-life, modulates release or bio-availability, facilitates purification, or improves or alters a particular route of administration. Similarly, the non-natural amino acid polypeptide can comprise chemical or enzyme cleavage sequences, protease cleavage sequences, reactive groups, antibody-binding domains (including but not limited to, FLAG or poly-His) or other affinity based sequences (including but not limited to, FLAG, poly-His, GST, etc.) or linked molecules (including but not limited to, biotin) that improve detection (including but not limited to, GFP), purification, transport thru tissues or cell membranes, prodrug release or activation, size reduction, or other traits of the polypeptide.

Additional Synthetic Methodology

[362] The non-natural amino acids described herein may be synthesized using methodologies described in the art or using the techniques described herein or by a

combination thereof. As an aid, the following table provides various starting electrophiles and nucleophiles which may be combined to create a desired functional group. The information provided is meant to be illustrative and not limiting to the synthetic techniques described herein.

[363] Table 1: Examples of Covalent Linkages and Precursors Thereof

Covalent Linkage Product	Electrophile	Nucleophile
Carboxamides	Activated esters	amines/anilines
Carboxamides	acyl azides	amines/anilines
Carboxamides	acyl halides	amines/anilines
Esters	acyl halides	alcohols/phenols
Esters	acyl nitriles	alcohols/phenols
Carboxamides	acyl nitriles	amines/anilines
Imines	Aldehydes	amines/anilines
Hydrazones	aldehydes or ketones	Hydrazines
Oximes	aldehydes or ketones	Hydroxylamines
Alkyl amines	alkyl halides	amines/anilines
Esters	alkyl halides	carboxylic acids
Thioethers	alkyl halides	Thiols
Ethers	alkyl halides	alcohols/phenols
Thioethers	alkyl sulfonates	Thiols
Esters	alkyl sulfonates	carboxylic acids
Ethers	alkyl sulfonates	alcohols/phenols
Esters	Anhydrides	alcohols/phenols
Carboxamides	Anhydrides	amines/anilines
Thiophenols	aryl halides	Thiols
Aryl amines	aryl halides	Amines
Thioethers	Azindines	Thiols
Boronate esters	Boronates	Glycols
Carboxamides	carboxylic acids	amines/anilines
Esters	carboxylic acids	Alcohols
hydrazines	Hydrazides	carboxylic acids
N-acylureas or Anhydrides	carbodiimides	carboxylic acids

Covalent Linkage Product	Electrophile	Nucleophile
Esters	diazoalkanes	carboxylic acids
Thioethers	Epoxides	Thiols
Thioethers	haloacetamides	Thiols
Ammotriazines	halotriazines	amines/anilines
Triazinyl ethers	halotriazines	alcohols/phenols
Amidines	imido esters	amines/anilines
Ureas	Isocyanates	amines/anilines
Urethanes	Isocyanates	alcohols/phenols
Thioureas	isothiocyanates	amines/anilines
Thioethers	Maleimides	Thiols
Phosphite esters	phosphoramidites	Alcohols
Silyl ethers	silyl halides	Alcohols
Alkyl amines	sulfonate esters	amines/anilines
Thioethers	sulfonate esters	Thiols
Esters	sulfonate esters	carboxylic acids
Ethers	sulfonate esters	Alcohols
Sulfonamides	sulfonyl halides	amines/anilines
Sulfonate esters	sulfonyl halides	phenols/alcohols

[364] In general, carbon electrophiles are susceptible to attack by complementary nucleophiles, including carbon nucleophiles, wherein an attacking nucleophile brings an electron pair to the carbon electrophile in order to form a new bond between the nucleophile and the carbon electrophile.

[365] Non-limiting examples of carbon nucleophiles include, but are not limited to alkyl, alkenyl, aryl and alkynyl Grignard, organolithium, organozinc, alkyl-, alkenyl , aryl- and alkynyl-tin reagents (organostannanes), alkyl-, alkenyl-, aryl- and alkynyl-borane reagents (organoboranes and organoboronates); these carbon nucleophiles have the advantage of being kinetically stable in water or polar organic solvents. Other non-limiting examples of carbon nucleophiles include phosphorus ylids, enol and enolate reagents; these carbon nucleophiles have the advantage of being relatively easy to generate from precursors well known to those skilled in the art of synthetic organic chemistry. Carbon nucleophiles, when used in

conjunction with carbon electrophiles, engender new carbon-carbon bonds between the carbon nucleophile and carbon electrophile.

[366] Non-limiting examples of non-carbon nucleophiles suitable for coupling to carbon electrophiles include but are not limited to primary and secondary amines, thiols, thiolates, and thioethers, alcohols, alkoxides, azides, semicarbazides, and the like. These non-carbon nucleophiles, when used in conjunction with carbon electrophiles, typically generate heteroatom linkages (C-X-C), wherein X is a hetereoatom, including, but not limited to, oxygen, sulfur, or nitrogen.

[367] The present disclosures provide targeting moieties conjugated with NRLs. In some aspects, the NRLs are capable of acting at nuclear receptors involved in metabolism or glucose homeostasis, and the conjugate provides superior biological effects on metabolism or glucose homeostasis compared to the peptide alone or the NRL alone. Without being bound by a theory of the invention, the targeting moieties may serve to target the NRLs to particular types of cells or tissues; or alternatively the NRLs may serve to target an antibody or enhance its transport into the cell, e.g. through binding of peptide to a receptor that internalizes the conjugate.

[368] The targeting moiety - NRL conjugates of the invention can be represented by the following formula:

Ab-L-Y

wherein **Ab** is a targeting moiety, **Y** is a NRL, and **L** is a linking group or a bond.

[369] The targeting moiety (**Ab**) in some embodiments is a molecule that binds to a defined soluble molecular target. The targeting moiety may bind a receptor, a cytokine, a hormone, a drug, or other soluble molecule. Antibody is used throughout the specification as a protypical example of a targeting moiety.

[370] In the present disclosures relating to Ab-L-Y conjugates, Y is a ligand that acts at any nuclear receptor, including any one of the "nuclear hormone receptor superfamily" (NHR superfamily) set forth in Table 1, or a separate nuclear receptor class or subgroup thereof. This NHR superfamily is composed of structurally related proteins found within the interior of cells that regulate the transcription of genes. These proteins include receptors for steroid and thyroid hormones, vitamins, and other "orphan" proteins for which no ligands have been found. Nuclear hormone receptors generally include at least one of a C4-type zinc finger DNA-Binding Domain (DBD) and/or a Ligand Binding Domain (LBD). The DBD functions to bind DNA in the vicinity of target genes, and the LBD binds and responds to its cognate

hormone. "Classical Nuclear Hormone Receptors" possess both a DBD and a LBD (e.g. Estrogen receptor alpha), while other nuclear hormone receptors possess only a DBD (e.g. Knirps, ORD) or only a LBD (e.g. Short Heterodimer Partner (SHP)).

Antibodies (Ab)

[371] Exemplary antibodies include α-PSMA antibodies having affinity and selectivity for PSMA.

[372] Other exemplary parent antibodies include those selected from, and without limitation, anti-estrogen receptor antibody, anti-progesterone receptor antibody, anti-p53 antibody, anti-HER-2/neu antibody, anti-EGFR antibody, anti-cathepsin D antibody, anti-Bcl-2 antibody, anti-E-cadherin antibody, anti-CA125 antibody, anti-CA15-3 antibody, anti-CA19-9 antibody, anti-c-erbB-2 antibody, anti-P-glycoprotein antibody, anti-CEA antibody, anti-retinoblastoma protein antibody, anti-ras oncoprotein antibody, anti-Lewis X antibody, anti-Ki-67 antibody, anti-PCNA antibody, anti-CD3 antibody, anti-CD4 antibody, anti-CD5 antibody, anti-CD7 antibody, anti-CD8 antibody, anti-CD9/p24 antibody, anti-CD10 antibody, anti-CD11c antibody, anti-CD13 antibody, anti-CD14 antibody, anti-CD15 antibody, anti-CD19 antibody, anti-CD20 antibody, anti-CD22 antibody, anti-CD23 antibody, anti-CD30 antibody, anti-CD31 antibody, anti-CD33 antibody, anti-CD34 antibody, anti-CD35 antibody, anti-CD38 antibody, anti-CD41 antibody, anti-LCA/CD45 antibody, anti-CD45RO antibody, anti-CD45RA antibody, anti-CD39 antibody, anti-CD100 antibody, anti-CD95/Fas antibody, anti-CD99 antibody, anti-CD106 antibody, anti-ubiquitin antibody, anti-CD71 antibody, anti-c-myc antibody, anti-cytokeratins antibody, anti-vimentins antibody, anti-HPV proteins antibody, anti-kappa light chains antibody, anti-lambda light chains antibody, anti-melanosomes antibody, anti-prostate specific antigen antibody, anti-S-100 antibody, anti-tau antigen antibody, anti-fibrin antibody, anti-keratins antibody and anti-Tn-antigen antibody.

[373] An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues

of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

[374] An antibody "which binds" a molecular target or an antigen of interest (non-limiting examples include PSMA, CD45, CD70, and CD74), is one capable of binding that antigen with sufficient affinity such that the antibody is useful in targeting a cell expressing the antigen. Where the antibody is one which binds, for example, PSMA, CD45, CD70, or CD74, it may be one which does not significantly cross-react with other proteins.

[375] Molecular targets for antibodies encompassed by the present invention include prostate-specific membrane antigen, CD proteins and their ligands, such as, but not limited to: (i) CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40, CD45, CD70, CD74, CD79.alpha. (CD79a), and CD79.beta. (CD79b); (ii) members of the ErbB receptor family such as the EGF receptor, HER2, HER3 or HER4 receptor; (iii) cell adhesion molecules such as LFA-1, Mac 1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM and .alpha.v/.beta.3 integrin, including either alpha or beta subunits thereof (e.g. anti-CD11a, anti-CD18 or anti-CD11b antibodies); (iv) growth factors such as VEGF; IgE; blood group antigens; flk2/flt3 receptor; obesity (OB) receptor; mpl receptor; CTLA-4; protein C, BR3, c-met, tissue factor, .beta.7 etc; and (v) cell surface and transmembrane tumor-associated antigens (TAA).

[376] In one embodiment of the invention the target cell specific protein or peptide is selected from prostate cell, anti-A33, C595, 4D5, trastuzumab (Herceptin), egf/R3, humanized h-R3, C225 (Erbitux), BrE-3, murine A7, C50, humanized MN-14, anti-A33, MSN-1, bivatuzumab, U36, KIS1, HuM195, anti-CD45, anti-CD19, TXU(anti-CD7)-pokeweed antiviral protein, M195, anti-CD23, apolizumab (Hu1D10), Campath-1H, N901, Ep2, somatostatin analogues (e.g. octreotide), tositumomab (Bexxar), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), HB22.7, anti-CD40, OC125, PAM4 and J591.

Anti-PSMA Antibody

[377] Anti prostate-specific membrane antigen (αPSMA) antibodies known in the art are suitable for use in the present invention. For example, sequences for αPSMA J591 antibody are given in U.S. Patent No. 7,666,425; αPSMA antibodies and antigen-binding fragments are given in U.S. Patent No. 8,114,965; each incorporated herein by reference. Other U.S. Patents disclosing αPSMA antibody sequences and/or PSMA binding agents, all of which are

herein incorporated by reference, include U.S. Patent No. 7,910,693; U.S. Patent No. 7,875,278; U.S. Patent No. 7,850, 971; U.S. Patent No. 7,514,078; U.S. Patent No. 7,476,513; U.S. Patent No. 7,381, 407; U.S. Patent No. 7,201,900; U.S. Patent No. 7,192,586; U.S. Patent No. 7,045,605; U.S. Patent No. 6,962,981; U.S. Patent No. 6,387,888; and U.S. Patent No. 6,150,508.

Anti-CD45 Antibody

[378] CD45 is a hematopoietic cell-specific transmembrane protein tyrosine phosphatase essential for T and B cell antigen receptor-mediated signaling and also plays a important role in cytokine receptor signaling, chemokine and cytokine response and apoptosis regulation in multiple different leukocyte cell subsets (T cells, B cells, NK cells, myeloid cells, granulocytes, and dendritic cells). CD45 constitutes nearly 10% of T and B cell surface protein. The protein includes a large extracellular domain, and a phosphatase containing cytosolic domain. CD45 may act as both a positive and negative regulator depending on the nature of the stimulus and the cell type involved. CD45 RNA transcripts are alternatively spliced at the N-terminus, which results in extracellular domains of various sizes. The protein controls the activity of Src-family kinases, which if left unregulated, can cause cancer and autoimmunity. Mice and humans lacking CD45 expression have been shown to be immunodeficient. Multiple human or rodent mutations that result in altered CD45 expression or functional activity are associated with distinct malignancies, including autoimmunity, immunodeficiency, overt activation of T cells, susceptibility to infection, type I or type II associated immune disorders, and haemotologic malignancies (reviewed in Tchilian and Beverly, Trends in Immunology, 2006).

[379] One embodiment of the present invention comprises administering to a patient in need of such treatment, an effective immunosuppressive amount of at least one compound which binds specifically to a CD45 leukocyte antigen present on T-cells conjugated to a nuclear receptor ligand. For example, the method of the present invention can be used to treat a patient undergoing transplant rejection, including graft-versus host disease or afflicted with an autoimmune disease. Preferably, the **Ab** binds to the CD45RB receptor. The present invention additionally provides pharmaceutical compositions comprising an effective immunosuppressive amount of at least one compound which specifically binds to a CD45 antigen in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments of the present invention, the compound of the present method is an antibody. In still other embodiments, the antibody administered will be capable of binding to the CD45RB leukocyte

antigen, the CD45RO leukocyte antigen, the CD45RA leukocyte antigen or the CD45RC leukocyte antigen. Most preferably, the antibody is capable of binding to the CD45RB or CD45RO leukocyte antigen.

[380] By "CD45" as used herein is meant a CD45 mRNA, protein, peptide, or polypeptide. The term "CD45" is also known in the art as PTPRC (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C), B220, GP180, LCA, LY5, and T200. The sequence of human CD45 cDNA is recorded at GenBank Accession No. NM.sub.--002838.2 (version dated Jan. 13, 2008) (see FIGS. 5A and 5B). Other human CD45 sequences are recorded at GenBank Accession Nos. NM.sub.--080921.2, NM.sub.--080922.2, NM.sub.--080923.2, Y00062.1, Y00638.1, BC014239.2, BC017863.1, BC031525.1, BC121086.1, BC121087.1, BC127656.1, BC127657.1, AY429565.1, AY567999.1, AK130573.1, DA670254.1, DA948670.1, AY429566.1, and CR621867.1. Mouse CD45 mRNA sequences are found at GenBank Accession Nos. NM.sub.--011210.2, AK054056.1, AK088215.1, AK154893.1, AK171802.1, BC028512.1, EF101553.1, L36091.1, M11934.1, M14342.1, M14343.1, M15174.1, M17320.1, and M92933.1. Rhesus monkey CD45 mRNA sequence are found at GenBank Accession No. XR.sub.--012672.1.

Anti-CD70 Antibody

[381] CD70 is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family of cell membrane-bound and secreted molecules that are expressed by a variety of normal and malignant cell types. The primary amino acid (AA) sequence of CD70 predicts a transmembrane type II protein with its carboxyl terminus exposed to the outside of cells and its amino terminus found in the cytosolic side of the plasma membrane (Bowman et al., 1994, J. Immunol. 152:1756-61; Goodwin et al., 1993, Cell 73:447-56). Human CD70 is composed of a 20 AA cytoplasmic domain, an 18 AA transmembrane domain, and a 155 AA extracytoplasmic domain with two potential N-linked glycosylation sites (Bowman et al., supra; Goodwin et al., supra). Specific immunoprecipitation of radioisotope-labeled CD70-expressing cells by anti-CD70 antibodies yields polypeptides of 29 and 50 kDa (Goodwin et al., supra; Hintzen et al., 1994, J. Immunol. 152:1762-73). Based on its homology to TNF-alpha and TNF-beta, especially in structural strands C, D, H and I, a trimeric structure is predicted for CD70 (Petsch et al., 1995, Mol. Immunol. 32:761-72).

[382] Original immunohistological studies revealed that CD70 is expressed on germinal center B cells and rare T cells in tonsils, skin, and gut (Hintzen et al., 1994, Int. Immunol.

6:477-80). Subsequently, CD70 was reported to be expressed on the cell surface of recently antigen-activated T and B lymphocytes, and its expression wanes after the removal of antigenic stimulation (Lens et al., 1996, Eur. J. Immunol. 26:2964-71; Lens et al., 1997, Immunology 90:38-45). Within the lymphoid system, activated natural killer cells (Orengo et al., 1997, Clin. Exp. Immunol. 107:608-13) and mouse mature peripheral dendritic cells (Akiba et al., 2000, J. Exp. Med. 191:375-80) also express CD70. In non-lymphoid lineages, CD70 has been detected on thymic medullar epithelial cells (Hintzen et al., 1994, supra; Hishima et al., 2000, Am. J. Surg. Pathol. 24:742-46).

[383] CD70 is not expressed on normal non-hematopoietic cells. CD70 expression is mostly restricted to recently antigen-activated T and B cells under physiological conditions, and its expression is down-regulated when antigenic stimulation ceases. Evidence from animal models suggests that CD70 may contribute to immunological disorders such as, e.g., rheumatoid arthritis (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104), psoriatic arthritis (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104), and lupus (Oelke et al., 2004, Arthritis Rheum. 50:1850-60). In addition to its potential role in inflammatory responses, CD70 is also expressed on a variety of transformed cells including lymphoma B cells, Hodgkin's and Reed-Sternberg cells, malignant cells of neural origin, and a number of carcinomas.

[384] In one embodiment of the present invention, anti-CD70 antibodies conjugated to a nuclear receptor ligand are provided. In some embodiments of the present invention, anti-CD70 antibodies conjugated to glucocorticoid receptor modulators is provided. In some embodiments, the anti-CD70 antibody includes at least one effector domain mediating at least an ADCC, ADCP or CDC response in the subject. I n some embodiments, the binding agent exerts a cytostatic, cytotoxic or immunomodulatory effect in the absence of conjugation to a therapeutic agent. In some embodiments, the binding agent is conjugated to a therapeutic agent that exerts a cytotoxic, cytostatic or immunodulatory effect. The antibody can compete for binding to CD70 with monoclonal antibody 1F6 or 2F2.

[385] In another aspect, a method of treating a CD70-expressing cancer in a subject is provided. The method generally includes administering to the subject an effective amount of a conjugated CD70 antibody. In some embodiments, the binding agent includes at least one effector domain mediating at least an ADCC, ADCP or CDC response in the subject. In some embodiments, the antibody exerts a cytostatic, cytotoxic or immunomodulatory effect in the absence of conjugation to a therapeutic agent. In some embodiments, the binding agent

is conjugated to a therapeutic agent that exerts a cytotoxic, cytostatic or immunodulatory effect.

[386] The anti-CD70 antibody can include, for example, an effector domain of a human IgM or IgG antibody. The IgG antibody can be, for example, a human IgG1 or IgG3 subtype. In some embodiments, the antibody includes a human constant region. In some embodiments, the CD70 binding agent competes for binding to CD70 with monoclonal antibody 1F6 or 2F2. In other embodiments, the antibody is a humanized 1F6. In other embodiments, the antibody is a humanized 2F2. The antibody can be, for example, monovalent, divalent or multivalent.

[387] The CD70-expressing cancer can be, a kidney tumor, a B cell lymphoma, a colon carcinoma, Hodgkin's Disease, multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, non-Hodgkin's lymphoma, a mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia, a nasopharyngeal carcinoma, brain tumor or a thymic carcinoma. The kidney tumor can be, for example, a renal cell carcinoma. The brain tumor can be, for example, a glioma, a glioblastoma, an astrocytoma or a meningioma. The subject can be, for example, a mammal, such as a human being.

[388] In another aspect, a method for treating an immunological disorder is provided. The method includes administering to a subject an effective amount of a CD70 binding agent. In some embodiments, the binding agent includes at least one effector domain mediating at least an ADCC, ADCP or CDC response in the subject. In some embodiments, the binding agent exerts a cytostatic, cytotoxic or immunomodulatory effect in the absence of conjugation to a therapeutic agent. In some embodiments, the binding agent is conjugated to a therapeutic agent that exerts a cytotoxic, cytostatic or immunodulatory effect. The CD70 binding agent can be, for example, an antibody. The antibody can include, for example, an effector domain of a human IgM or IgG antibody. The IgG antibody can be, for example, a human IgG_1 or IgG_3 subtype. In some embodiments, the antibody includes a human constant region.

[389] The immunological disorder can be, for example, a T cell-mediated immunological disorder. In some embodiments, the T cell mediated immunogical disorder comprises activated T cells expressing CD70. In some embodiments, resting T cells are not substantially depleted by administration of the antibody-drug conjugate. The T cell-mediated immunological disorder also can be, for example, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), Type I diabetes, asthma, atopic dermatitus, allergic rhinitis, thrombocytopenic purpura, multiple sclerosis, psoriasis, Sjogren's syndrome,

Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, primary biliary cirrhosis, Wegener's granulomatosis, tuberculosis, or graft versus host disease. In other embodiments, the immunological disorder is an activated B-lymphocyte disorder. The subject can be, for example, a mammal, such as a human being.

[390] The anti-CD70 antibody can be a monoclonal, chimeric or humanized antibody, or a fragment or derivative thereof. In some embodiments, the anti-CD70 antibody includes an antibody constant region or domain. The antibody constant region or domain can be, for example, of the IgG subtype. In an exemplary embodiment, the anti-CD70 antibody, fragment or derivatives thereof, competes with the murine monoclonal antibody (mAb) 1F6 or 2F2 for binding to CD70 and comprises human antibody constant region sequences. In another exemplary embodiment, the anti-CD70 antibody, or fragment or derivative thereof, has an effector domain (e.g., an Fc portion) that can interact with effector cells or complement to mediate a cytotoxic, cytostatic, and/or immunomodulatory effect that results in the depletion or inhibition of the proliferation of CD70-expressing cells. In another exemplary embodiment, the anti-CD70 antibody lacks effector function. In another exemplary embodiment, the anti-CD70 antibody is conjugated to a therapeutic agent. Also included are kits and articles of manufacture comprising a CD70 binding agent (e.g., a humanized anti-CD70 antibody).

Anti-CD74 Antibody

[391] The human leukocyte antigen-DR(HLA-DR) is one of three polymorphic isotypes of the class II major histocompatibility complex (MHC) antigen. Because HLA-DR is expressed at high levels on a range of hematologic malignancies, there has been considerable interest in its development as a target for antibody-based lymphoma therapy. However, safety concerns have been raised regarding the clinical use of HLA-DR-directed antibodies, because the antigen is expressed on normal as well as tumor cells. (Dechant et al., 2003, Semin Oncol 30:465-75) HLA-DR is constitutively expressed on normal B cells, monocytes/macrophages, dendritic cells, and thymic epithelial cells. In addition, interferon-gamma may induce HLA class II expression on other cell types, including activated T and endothelial cells (Dechant et al., 2003). The most widely recognized function of HLA molecules is the presentation of antigen in the form of short peptides to the antigen receptor of T lymphocytes. In addition, signals delivered via HLA-DR molecules contribute to the functioning of the immune system by up-regulating the activity of adhesion molecules, inducing T-cell antigen counterreceptors,

and initiating the synthesis of cytokines. (Nagy and Mooney, 2003, J Mol Med 81:757-65; Scholl et al., 1994, Immunol Today 15:418-22)

[392] The CD74 antigen is an epitope of the major histocompatibility complex (MHC) class II antigen invariant chain, Ii, present on the cell surface and taken up in large amounts of up to 8.times.10.sup.6 molecules per cell per day (Hansen et al., 1996, Biochem. J., 320: 293-300). CD74 is present on the cell surface of B-lymphocytes, monocytes and histocytes, human B-lymphoma cell lines, melanomas, T-cell lymphomas and a variety of other tumor cell types. (Hansen et al., 1996, Biochem. J., 320: 293-300) CD74 associates with α/β chain MHC II heterodimers to form MHC II αβIi complexes that are involved in antigen processing and presentation to T cells (Dixon et al., 2006, Biochemistry 45:5228-34; Loss et al., 1993, J Immunol 150:3187-97; Cresswell et al., 1996; Cell 84:505-7).

[393] CD74 plays a role in cell proliferation and survival. Binding of the CD74 ligand, macrophage migration inhibitory factor (MIF), to CD74 activates the MAP kinase cascade and promotes cell proliferation (Leng et al., 2003, J Exp Med 197:1467-76). Binding of MIF to CD74 also enhances cell survival through activation of NF-.kappa.B and Bcl-2 (Lantner et al., 2007, Blood 110:4303-11).

[394] Antibodies against CD74 and/or HLA-DR have been reported to show efficacy against cancer cells. Such anti-cancer antibodies include the anti-CD74 hLL1 antibody (milatuzumab) and the anti-HLA-DR antibody hL243 (also known as IMMU-114) (Berkova et al., Expert Opin. Investig. Drugs 19:141-49; Burton et al., 2004, Clin Cancer Res 10:6605-11; Chang et al., 2005, Blood 106:4308-14; Griffiths et al., 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71; Stein et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5556s-63s; Stein et al., 2010, Blood 115:5180-90). In some embodiments, an anti-CD74 antibody conjugated to a glucocorticoid receptor modulator via a non-naturally encoded amino acid is provided. In other embodiments of the present invention, an anti-CD74 antibody is conjugated toan interferon gamma via a non-naturally encoded amino acid. In other embodiments, the conjugated anti-CD74 antibody will be administered to a patient in need thereof. In some embodiments, the administration of interferon-gamma increases the expression of CD74 and enhances the sensitivity of cancer cells, autoimmune disease cells or immune dysfunction cells to the cytotoxic effects of anti-CD74 antibodies.

[395] Many examples of anti-CD74 antibodies are known in the art and any such known antibody or fragment thereof may be utilized. In a preferred embodiment, the anti-CD74 antibody is an hLL1 antibody (also known as milatuzumab) that comprises the light chain

complementarity-determining region (CDR) sequences CDR1 (RSSQSLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO:1), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO:2), and CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO:3) and the heavy chain variable region CDR sequences CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:4), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO:5), and CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:6). A humanized LL1 (hLL1) anti-CD74 antibody suitable for use is disclosed in U.S. Pat. No. 7,312,318, incorporated herein by reference from Col. 35, line 1 through Col. 42, line 27 and FIG. 1 through FIG. 4. However, in alternative embodiments, other known anti-CD74 antibodies may be utilized, such as LS-B1963, LS-B2594, LS-B1859, LS-B2598, LS-05525, LS-C44929, etc. (LSBio, Seattle, Wash.); LN2 (BIOLEGEND.RTM., San Diego, Calif.); PIN.1, SPM523, LN3, CerCLIP.1 (ABCAM.RTM., Cambridge, Mass.); At14/19, Bu45 (SEROTEC.RTM., Raleigh, N.C.); 1D1 (ABNOVA.RTM., Taipei City, Taiwan); 5-329 (EBIOSCIENCE.RTM., San Diego, Calif.); and any other anti-CD74 antibody known in the art.

[396] The anti-CD74 antibody may be selected such that it competes with or blocks binding to CD74 of an LL1 antibody comprising the light chain CDR sequences CDR1 (RSSQSLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO:1), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO:2), and CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO:3) and the heavy chain variable region CDR sequences CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:4), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO:5), and CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:6). Alternatively, the anti-CD74 antibody may bind to the same epitope of CD74 as an LL1 antibody. In still other alternatives, the anti-CD74 antibody may exhibit a functional characteristic such as internalization by Raji lymphoma cells in culture or inducing apoptosis of Raji cells in cell culture when cross-linked. These embodiments include anti-CD74 antibodies comprising a non-naturally encoded amino acid. These embodiments also include anti-CD74 antibodies comprising more than one non-natuarlly encoded amino acids.

[397] Alternative embodiments may involve use of anti-HLA-DR antibodies or fragments thereof and treatment with interferon-gamma to increase expression of HLA-DR and enhance sensitivity of cancer or autoimmune disease cells to anti-HLA-DR antibodies. Many examples of anti-HLA-DR antibodies are known in the art and any such known antibody or fragment thereof may be utilized. In a preferred embodiment, the anti-HLA-DR antibody is an hL243 antibody (also known as IMMU-114) that comprises the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:7), CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO:8), and CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO:9) and the light chain CDR sequences

CDR1 (RASENIYSNLA, SEQ ID NO:10), CDR2 (AASNLAD, SEQ ID NO:11), and CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO:12). A humanized L243 anti-HLA-DR antibody suitable for use is disclosed in U.S. Pat. No. 7,612,180, incorporated herein by reference in its entirety, as well as specific reference to the disclosure from Col. 46, line 45 through Col. 60, line 50 and FIG. 1 through FIG. 6. However, in alternative embodiments, other known anti-HLA-DR antibodies may be utilized, such as 1D10 (apolizumab) (Kostelny et al., 2001, Int J Cancer 93:556-65); MS-GPC-1, MS-GPC-6, MS-GPC-8, MS-GPC-10, etc. (U.S. Pat. No. 7,521,047); Lym-1, TAL 8.1, 520B, ML11C11, SPM289, MEM-267, TAL 15.1, TAL 1B5, G-7, 4D12, Bra30, etc. (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif.); TAL 16.1, TU36, C120 (ABCAM.RTM., Cambridge, Mass.); and any other anti-HLA-DR antibody known in the art.

[398] The anti-HLA-DR antibody may be selected such that it competes with or blocks binding to HLA-DR of an L243 antibody comprising the heavy chain CDR sequences CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:7), CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO:8), and CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO:9) and the light chain CDR sequences CDR1 (RASENIYSNLA, SEQ ID NO:10), CDR2 (AASNLAD, SEQ ID NO:11), and CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO:12). Alternatively, the anti-HLA-DR antibody may bind to the same epitope of HLA-DR as an L243 antibody.

[399] The anti-CD74 and/or anti-HLA-DR antibodies or fragments thereof may be used as naked antibodies, alone or in combination with one or more therapeutic agents. Alternatively, the antibodies or fragments may be utilized as immunoconjugates, attached to one or more therapeutic agents. (For methods of making immunoconjugates, see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,699,784; 4,824,659; 5,525,338; 5,677,427; 5,697,902; 5,716,595; 6,071,490; 6,187,284; 6,306,393; 6,548,275; 6,653,104; 6,962,702; 7,033,572; 7,147,856; and 7,259,240, the Examples section of each incorporated herein by reference.) Therapeutic agents may be selected from the group consisting of a radionuclide, an enzyme, an immunomodulator, an anti-angiogenic agent, a pro-apoptotic agent, a cytokine, a hormone, an oligonucleotide molecule (e.g., an antisense molecule or a gene) or a second antibody or fragment thereof. Antisense molecules may include antisense molecules that correspond to bcl-2 or p53. However, other antisense molecules are known in the art, as described below, and any such known antisense molecule may be used. Second antibodies or fragments thereof may bind to an antigen selected from the group consisting of carbonic anhydrase IX, CCCL19, CCCL21, CSAp, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18,

CD19, IGF-1R, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1.alpha., AFP, PSMA, CEACAM5, CEACAM6, B7, ED-B of fibronectin, Factor H, FHL-1, Flt-3, folate receptor, GROB, HMGB-1, hypoxia inducible factor (HIF), HM1.24, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, NCA-95, NCA-90, Ia, HM1.24, EGP-1, EGP-2, HLA-DR, tenascin, Le(y), RANTES, T101, TAC, Tn antigen, Thomson-Friedenreich antigens, tumor necrosis antigens, TNF-.alpha., TRAIL receptor (R1 and R2), VEGFR, EGFR, P1GF, complement factors C3, C3a, C3b, C5a, C5, and an oncogene product.

[400] The therapeutic agent may be selected from the group consisting of aplidin, azaribine, anastrozole, azacytidine, bleomycin, bortezomib, bryostatin-1, busulfan, calicheamycin, camptothecin, 10-hydroxycamptothecin, carmustine, celebrex, chlorambucil, cisplatin, irinotecan (CPT-11), SN-38, carboplatin, cladribine, cyclophosphamide, cytarabine, dacarbazine, docetaxel, dactinomycin, daunomycin glucuronide, daunorubicin, dexamethasone, diethylstilbestrol, doxorubicin, doxorubicin glucuronide, epirubicin glucuronide, ethinyl estradiol, estramustine, etoposide, etoposide glucuronide, etoposide phosphate, floxuridine (FUdR), 3',5'-O-dioleoyl-FudR (FUdR-dO), fludarabine, flutamide, fluorouracil, fluoxymesterone, gemcitabine, hydroxyprogesterone caproate, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, L-asparaginase, leucovorin, lomustine, mechlorethamine, medroprogesterone acetate, megestrol acetate, melphalan, mercaptopurine, 6-mercaptopurine, methotrexate, mitoxantrone, mithramycin, mitomycin, mitotane, phenyl butyrate, prednisone, procarbazine, paclitaxel, pentostatin, PSI-341, semustine streptozocin, tamoxifen, taxanes, taxol, testosterone propionate, thalidomide, thioguanine, thiotepa, teniposide, topotecan, uracil mustard, velcade, vinblastine, vinorelbine, vincristine, ricin, abrin, ribonuclease, onconase, rapLR1, DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin, and Pseudomonas endotoxin.

[401] The therapeutic agent may be an enzyme selected from the group consisting of malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-V-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-

galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase.

[402] An immunomodulator of use may be selected from the group consisting of a cytokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), erythropoietin, thrombopoietin and combinations thereof. Exemplary immunomodulators may include IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, interferonα, interferon-β, interferon-γ, G-CSF, GM-CSF, and mixtures thereof.

[403] Exemplary anti-angiogenic agents may include angiostatin, endostatin, basculostatin, canstatin, maspin, anti-VEGF binding molecules, anti-placental growth factor binding molecules, or anti-vascular growth factor binding molecules.

[404] In certain embodiments of the present invention, the anti-CD74 or anti-HLA-DR complex may be formed by a technique known as dock-and-lock (DNL) (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 7,521,056; 7,527,787; 7,534,866; 7,550,143 and U.S. Patent Publ. No. 20090060862, filed Oct. 26, 2007, the Examples section of each of which is incorporated herein by reference.) Generally, the DNL technique takes advantage of the specific and high-affinity binding interaction between a dimerization and docking domain (DDD) sequence derived from cAMP-dependent protein kinase and an anchor domain (AD) sequence derived from any of a variety of AKAP proteins. The DDD and AD peptides may be attached to any protein, peptide or other molecule. Because the DDD sequences spontaneously dimerize and bind to the AD sequence, the DNL technique allows the formation of complexes between any selected molecules that may be attached to DDD or AD sequences. Although the standard DNL complex comprises a trimer with two DDD-linked molecules attached to one AD-linked molecule, variations in complex structure allow the formation of dimers, trimers, tetramers, pentamers, hexamers and other multimers. In some embodiments, the DNL complex may comprise two or more antibodies, antibody fragments or fusion proteins which bind to the same antigenic determinant or to two or more different antigens. The DNL complex may also comprise one or more other effectors, such as a cytokine or PEG moiety.

[405] Also disclosed is a method for treating and/or diagnosing a disease or disorder that includes administering to a patient a therapeutic and/or diagnostic composition that includes any of the aforementioned antibodies or fragments thereof. Typically, the composition is administered to the patient intravenously, intramuscularly or subcutaneously at a dose of 20-5000 mg.

[406] In some embodiments of the present invention, the disease or disorder is associated with CD74- and/or HLA-DR-expressing cells and may be a cancer, an immune dysregulation disease, an autoimmune disease, an organ-graft rejection, a graft-versus-host disease, a solid tumor, non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, a B-cell malignancy, or a T-cell malignancy. A B-cell malignancy may include indolent forms of B-cell lymphomas, aggressive forms of B-cell lymphomas, chronic lymphatic leukemias, acute lymphatic leukemias, and/or multiple myeloma. Solid tumors may include melanomas, carcinomas, sarcomas, and/or gliomas. A carcinoma may include renal carcinoma, lung carcinoma, intestinal carcinoma, stomach carcinoma, breast carcinoma, prostate cancer, ovarian cancer, and/or melanoma.

[407] Exemplary autoimmune diseases include acute idiopathic thrombocytopenic purpura, chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, dermatomyositis, Sydenham's chorea, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, rheumatic fever, polyglandular syndromes, bullous pemphigoid, diabetes mellitus, Henoch-Schonlein purpura, post-streptococcal nephritis, erythema nodosum, Takayasu's arteritis, Addison's disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, sarcoidosis, ulcerative colitis, erythema multiforme, IgA nephropathy, polyarteritis nodosa, ankylosing spondylitis, Goodpasture's syndrome, thromboangitis obliterans, Sjogren's syndrome, primary biliary cirrhosis, Hashimoto's thyroiditis, thyrotoxicosis, scleroderma, chronic active hepatitis, polymyositis/dermatomyositis, polychondritis, pemphigus vulgaris, Wegener's granulomatosis, membranous nephropathy, amyotrophic lateral sclerosis, tabes dorsalis, giant cell arteritis/polymyalgia, pernicious anemia, rapidly progressive glomerulonephritis, psoriasis, or fibrosing alveolitis. However, the skilled artisan will realize that any disease or condition characterized by expression of CD74 and/or HLA-DR may be treated using the claimed compositions and methods.

[408] Table 2 presents a list of human CD antigen designations, antibodies to which may be used as targeting moieties in the present invention.

Table 2:

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
CD1a CD1b	Cortical thymocytes, Langerhans cells, Dendritic cells, B cells (CD1c), Intestinal epithelium (CD1d)	43-49	MHC class I-like molecule, associated with b2-microglobulin.		Ig superfamily (IgSF)

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
CD1c CD1d			May have specialised role in antigen presentation		
CD2	T cells, thymocytes, NK cells	45-58	Adhesion molecule, binding CD58 (LFA-3). Can activate T cells	T11, LFA-2	IgSF
CD2R	Activated T cells	45-58	activation-dependent conformational form of CD2	T11-3	IgSF
CD3	Thymocytes, T cells	g:25-28 d:20 e:20 z:16 h:22	Associated with the T cell antigen receptor. Required for cell surface expression of and signal transduction by TCR.	T3	IgSF (gde) z/h related to FcR g chain
CD4	Thymocyte subsets, helper and inflammatory T cells (about two thirds of peripheral T cells), monocytes, macrophages	55	Coreceptor for MHC class II molecules. Binds lck on cytoplasmic face of membrane. Receptor for HIV-I and HIV-2 gp120.	T4, L3T4	IgSF
CD5	Thymocytes, T cells, subset of B cells	67	Binds to CD72	T1, Ly1	Scavenger receptor
CD6	Thymocytes, T cells, B cell CLL	100-130	unknown.	T12	Scavenger receptor
CD7	Pluripotential hematopoietic cells, thymocytes, T cells	40	unknown. Marker for T cell ALL and pluripotential stem cell leukemias		IgSF
CD8	Thymocyte subsets, cytotoxic T cells (about one third of peripheral T cells)	a: 32-34 b: 32-34	Coreceptor for MHC class I molecules. Binds lck on	T8, Lyt2,3	IgSF

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
			cytoplasmic face of membrane		
CD9	Pre-B cells, eosinophils, basophils, platelets	22-27	possible role in platelet aggregation and activation		tetraspanning membrane protein
CD10	B and T cell precursors, bone marrow stromal cells	100	zinc metalloproteinase, marker for pre B ALL	Neutral endopeptidase, Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen (CALLA)	
CD11a	lymphocytes, granulocytes, monocytes and macrophages	180	aL subunit of integrin LFA-1 (associated with CD18) ; binds to CD54 (ICAM-1), ICAM-2 and ICAM-3	LFA-1	
CD11b	myeloid and natural killer cells	170	aM subunit of integrin CR3 (associated with CD18) ; binds CD54, complement component iC3b and extracellular matrix proteins	Mac-1	
CD11c	myeloid cells	150	aX subunit of integrin CR4 (associated with CD18) ; binds fibrinogen	CR4, p150, 95	
CDw12	monocytes, granulocytes, platelets	90-120	unknown		
CD13	myelomonocytic cells	150-170	zinc metalloproteinase	aminopeptidase N	
CD14	myelomonocytic cells	53-55	receptor for complex of LPS and LPS binding protein (LBP)		

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
CD15 & CD15S	neutrophils, eosinophils, monocytes		branched pentasaccharide, expressed on glycolipids and many cell surface glycoproteins; the sialylated form is a ligand for CD62E (ELAM)	Lewsi-x (Lex)	
CD15u	sulphated CD15				
CD16 a & b	neutrophils, NK cells, macrophages	50-80	component of low affinity Fc receptor, FcgRIII, mediates phagocytosis and ADCC.	FcgRIII	IgSF
CDw17	neutrophils, monocytes, platelets		lactosyl ceramide, a cell surface glycosphingolipid		
CD18	Leukocytes	95	integrin b2 subunit, associates with CD11a,b and c.		
CD19	B cells	95	forms complex with CD21 (CR2)and CD81 (TAPA-1); coreceptor for B cells		IgSF
CD20	B cells	33-37	possible role in regulating B cell activation		tetraspanning membrane protein
CD21	mature B cells, FDC	145	receptor for complement component C3d, EBV. With CD19 and CD81 forms coreceptor for B cells	CR2	complement control protein (CCP) superfamily
CD22	mature B cells	a: 130	Adhesion of B	BL-CAM	IgSF

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
		b: 140	cells to monocytes, T cells		
CD23	mature B cells, activated macrophages, eosinophils, follicular dendritic cells, platelets	45	low affinity receptor for IgE, ligand for CD19:CD21:CD 81 coreceptor	FceRII	C-type lectin
CD24	B cells, granulocytes	35-45	unknown	possible human homologue of mouse Heat Stable Antigen (HSA) or J11d.	
CD25	activated T cells, B cells, monocytes	a:55 :b75	IL-2 receptor	Tac	a:CCP b: cytokine receptor superfamily
CD26	Activated B and T cells, macrophages	110	protease. Recently implicated in HIV entry into cells.	Dipeptidyl peptidase IV	
CD27	Medullary thymocytes, T cells	50-55	unknown		NGF receptor superfamily
CD28	T cell subsets, activated B cells	44	Activation of naive T cells, receptor for costimulatory signal (signal 2) binds CD80 (B7-1) and B7-2	Tp44	IgSF
CD29	Leukocytes	130	Integrin b1 subunit, associates with CD49a in VLA-1 integrin		
CD30	Activated B and T cells	105-120	unknown	Ki-1	NGF receptor superfamily
CD31	monocytes, platelets, granulocytes, B cells, endothelial cells	130-140	Possibly an adhesion molecule	PECAM-1	IgSF
CDw32	Monocytes,	40	low affinity Fc	FcgRII	IgSF

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
	granulocytes, B cells eosinophils		receptor for aggregated Ig/immune complexes		
CD33	myeloid progenitor cells, monocytes	67	unknown		IgSF
CD34	hematopoietic precursors, capillary endothelium	105-120	Ligand for CD62 (L-selectin)		
CD35	Erythrocytes, B cells, monocytes, neutrophils, eosinophils, FDC	250	Complement receptor 1, binds C3B and C4b, mediates phagocytosis	CR1	CCP superfamily
CD36	platelets, monocytes	88	unknown	platelet GPIV	
CD37	mature B cells, mature T cells, myeloid cells	40-52	unknown		tetraspanning membrane protein
CD38	early B and T cells, activated T cells, germinal centre B cells, plasma cells	45	unknown		
CD40	B cells, monocytes, dendritic cells	50	receptor for costimulatory signal for B cells, binds CD40 Ligand (T-BAM),		NGF receptor superfamily
CD40L (CD154)	activated CD4 T cells	39	ligand for CD40,	T-BAM	TNF-like
CD41	platelets, megakaryocytes	125/22 dimer	aIIb integrin, associates with CD61 to form GPIIb, binds fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and thrombospondin		
CD42a , b,	platelets, megakaryocytes	a: 23 b: 135, 23 c: 22 d: 85	binds von Willebrand factor, thrombin; essential for platelet adhesion	a: GPIX b: GPIba c: GPIbb d: GPV	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
c, d			at sites of injury		
CD43	leukocytes, except resting B cells	115-135 (neutrophils) 95-115 (T cells)	binds CD54 (ICAM-1)	leukosialin, sialophorin	
CD44	leukocytes, erythrocytes	80-95	binds hyaluronic acid, mediates adhesion of leukocytes	Hermes antigen, Pgp-1	
CD45	leukocytes	180-240	tyrosine phosphatase, augments signalling through antigen receptor of B and T cells, multiple isoforms result from alternative splicing (see below)	Leukocyte common antigen (LCA), T200, B220	
CD45RO	T cell subsets, B cell subsets, monocytes, macrophages	180	isoform of CD45 containing none of the A, B and C exons		
CD45RA	B cells, T cell subsets (naive T cells) monocytes	205-220	isoforms of CD45 containing the A exon		
CD45RB	T cell subsets, B cells, monocytes, macrophages, granulocytes	190-220	isoforms of CD45 containing the B exon	T200	
CD45RC	Restricted T200				
CD46	hematopoietic and non-hematopoietic nucleated cells	56/66 (splice variants)	membrane cofactor protein, binds to C3b and C4b to permit their degradation by Factor I	MCP	CCP superfamily
CD47	all cells	47-52	unknown, associated with		

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
			Rh blood group		
CD47R	previously CDw149				
CD48	leukocytes	40-47	unknown	Blast-1	IgSF
CD49a	activated T cells, monocytes	210	a1 integrin, associates with CD29, binds collagen, laminin	VLA-1	
CD49b	B cells, monocyte, platelets	165	a2 integrin, associates with CD29, binds collagen, laminin	VLA-2	
CD49c	B cells	125	a3 integrin, associates with CD29, bindslaminin, fibronectin	VLA-3	
CD49d	B cells, thymocytes	150	a4 integrin, associates with CD29, binds fibronectin, PeyerÕs Patch HEV, VCAM-1	VLA-4	
CD49e	memory T cells, monocytes, platelets	135, 25 dimer	a5 integrin, associates with CD29, binds fibronectin	VLA-5	
CD49f	memory T cells, thymocytes, monocytes	120, 25 dimer	a6integrin, associates with CD29, binds laminin	VLA-6	
CD50	thymocytes, T cells, B cells,monocytes, granulocytes	130	unknown	ICAM3	
CD51	platelets, megakaryocytes	125,24 dimer	av integrin, associates with CD61, binds vitronectin, von Willebrand factor, fibrinogen and thrombospondin	vitronectin receptor	
CD52	thymocytes, T cells, B	21-28	unknown, target	CAMPATH-	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
	cells (not plasma cells), monocytes, granulocytes		for antibodies used therapeutically to deplete T cells	1	
CD53	leukocytes	35-42	unknown	MRC OX44	tetraspanning membrane protein
CD54	hematopoietic and non-hematopoietic cells	85-110	InterCellular Adhesion Molecule, (ICAM)-1 binds CD11a/CD18 (LFA-1) and CD11b/CD18 (Mac-1) integrins, receptor for rhinovirus	ICAM-1	IgSF
CD55	hematopoietic and non-hematopoietic cells	60-70	Decay Accelerating Factor (DAF), binds C3b, disassembles C3/C5 convertase	DAF	CCP superfamily
CD56	NK cells	175-185	isoform of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), adhesion molecule	NKH-1	IgSF
CD57	NK cells subsets of T cells, B cells and monocytes		oligosaccharide, found on many cell surface glycoproteins	HNK-1, Leu-7	
CD58	hematopoietic and non-hematopoietic cells	55-70	Leukocyte Function-associated Antigen-3 (LFA-3), binds CD2, adhesion molecule	LFA-3	IgSF
CD59	hematopoietic and non-hematopoietic cells	19	binds comlement	Protectin, Mac	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
			components C8 and C9, blocks assembly of membrane attack complex	inhibitor	
CD60	T cell subsets, platelets, monocytes		oligosaccharide present on gangliosides		
CD60a	GD3				
CD60b	9-O-acetyl-GD3				
CD60c	7-O-acetyl-GD3				
CD61	platelets, megakaryocytes, macrophages	105	integrin b3 subunit, associates with CD41 (GPIIb/IIIa) or CD51 (vitronectin receptor)		
CD62E	endothelium	140	endothelium leukocyte adhesion molecule (ELAM), bindssialyl-Lewis x, mediates rolling interaction of neutrophils on endothelium	ELAM-1, E-selectin	C type lectin
CD62L	B cells, T cells, monocytes, NK cells	150	leukocyte adhesion molecule (LAM), binds CD34, GlyCAM, mediates rolling interactions with endothelium	LAM-1, L-selectin, LECAM-1	C type lectin
CD62P	platelets, megakaryocytes, endothelium	140	adhesion molecule, binds sialyl Lewis x, mediates interaction of platelets with	P-selectin, PADGEM	C type lectin

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
			neutrophils, monocytes and rolling interaction of neutrophils on endothelium		
CD63	activated platelets, monocytes, macrophages	53	unknown, is lysosomal membrane protein translocated to cell surface after activation		tetraspanning membrane protein
CD64	monocytes, macrophages	72	hign affinity receptor for IgG	FcgRI	IgSF
	myeloid cells		oligosaccharide component of a ceramide dodecasaccharid e		
CD65	Ceramide dodecasaccharide 4c				
CD66a	neutrophils	160-180	unknown, member of carcinoembryoni c antigen (CEA) family (see below)	biliary glycoprotein -1 (BGP-1)	IgSF
CD66b	granulocytes	95-100	unknown, member of carcinoembryoni c antigen (CEA) family	previously CD67	IgSF
CD66c	neutrophils, colon carcinoma	90	unknown, member of carcinoembryoni c antigen (CEA) family	Nonspecific Crossreactin g Antigen (NCA)	IgSF
CD66d	neutrophils	30	unknown, member of carcinoembryoni c antigen (CEA) family		IgSF
CD66e	adult colon epithelium,	180-200	unknown,	CarcinoEmb	IgSF

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
	colon carcinoma		member of carcinoembryonic antigen (CEA) family	ryonic Antigen (CEA)	
CD66f	Pregnancy specific glycoprotein				
CD68	monocytes, macrophages, neutrophils, basophils, large lymphocytes	110	unknown	macrosialin	
CD69	activated B cells, activated T cells, activated macrophages, activated NK cells	28, 32 homodimer	unknown, early activation antigen	Activation Inducer Molecule (AIM)	
CD70	activated B cells, activated T cells, macrophages	75,95,170	unknown	Ki-24	
CD71	activated leukocytes	90-95 homodimer	transferrin receptor	T9	
CD72	B cells	42 homodimer	unknown, ligand for CD5	Lyb-2	C type lectin
CD73	B cell subsets, T cell subsets	69	ecto-5Õ-nucleotidase, dephosphorylates nucleotides to allow nucleoside uptake		
CD74	B cells, macrophages, monocytes, MHC class II positive cells	33,35,41,43 (alternate initiation and splicing)	MHC class II associated Invariant chain	Ii, Ig	
CD75	mature B cells, T cell subsets		unknown, possibly oligosaccharide, dependent on sialylation		
CDw76 CD75s	alpha-2,6-sialylated lactosamines		unknown, possibly oligosaccharide, dependent on sialylation		
CD77	germinal center B cells		unknown,	Globotriaocylceramide (Gb3), Pk	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
				blood group	
CDw78 (deleted)	B cells		unknown	Ba	
CD79a, CD79b	B cells	a: 32-33 b: 37-39	components of B cell antigen receptor analogous to CD3, required for cell surface expression and signal transduction	Iga, Igb	IgSF
CD80	B cell subset	60	costimulator, ligand for CD28 and CTLA-4	B7 (now B7-1), BB1	IgSF
CD81	lymphocytes	26	associates with CD19, CD21 to form B cell coreceptor	Target of AntiProliferative Antibody (TAPA-1)	tetraspanning membrane protein
CD82	leukocytes	50-53	unknown	R2	tetraspanning membrane protein
CD83	Activated B cells, activated T cells, circulating dendritic cells (veil cells)	43		HB15	
CDw84	monocytes, platelets, circulating B cells	73		GR6	
CD85	ILT/LIR family				
CD86	monocytes, activated B cells	80		FUN-1, GR65	
CD87	granulocytes, monocytes, macrophages, activated T cells	50-65	Urokinase plasminogen activator receptor	UPA-R	
CD88	polymorphonuclear leukocytes, macrophages, mast cells	40	Receptor for complement component C5a	C5aR	rhodopsin superfamily
CD89	monocytes, macrophages, granulocytes,	50-70	IgA receptor	FcaR	IgSF

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
	neutrophils, B cell subsets, T cell subsets				
CD90	CD34+ prothymocytes (human) thymocytes, T cells (mouse)	18	unknown	Thy-1	IgSF
CD91	monocytes	600	a2 macroglobulin receptor see lipoprotein	unknown	
CDw92	neutrophils, monocytes, platelets, endothelium	70	unknown	GR9	
CD93	neutrophils, monocytes, endothelium	120	unknown	GR11	
CD94	T cell subsets, NK cells	43	unknown	KP43	
CD95	wide variety of cell lines in vivodistribution uncertain	43	binds TNF-like ligand, induces apoptosis	Apo-1, Fas	NGF receptor superfamily
CD96	activated T cells	160	Unknown	T cell ACTivation Increased Late Expression (TACTILE)	
CD97	activated cells	74, 80, 90	unknown	GR1	
CD98	T cells, B cells, NK cells, granulocytes, all human cell lines	80, 40 heterodimer	unknown	4F2	
CD99	Peripheral blood lymphocytes, thymocytes	32	Unknown	MIC2, E2	
CD100	Broad expression on haematopoietic cells	150	unknown	GR3	
CD101	Granulocytes, macrophages	140	Unknown	BPC#4,BB27;BA27	
CD102	Resting lymphocytes, monocytes, strongest on vascular endothelial cells	55-65	binds CD11a/CD18 (LFA-1) but not CD11b/CD18 (Mac-1)	ICAM-2	IgSF
CD103	Intraepithelial lymphocytes, 2-6% of peripheral blood lymphocytes	150,25	aE integrin	HML-1, a6, aE integrin	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
CD104	Epithelia, Schwann cells, some tumour cells	220	b4 integrin	b4, b4 integrin	
CD105	Endothelial cells, bone marrow cell subset, *in vitro* activated macrophages	95, homodimer	unknown, possibly ligand for an integrin	Endoglin	
CD106	Endothelial cells	100,110	Adhesion molecule, ligand for VLA-4	VCAM-1	IgSF
CD107a	Activated platelets	110	Unknown, is lysosomal membrane protein translocated to the cell surface after activation	Lysosomal Associated Membrane Protein-1 (LAMP-1)	
CD107b	activated platelets	120	Unknown, is lysosomal membrane protein translocated to the cell surface after activation	LAMP-2	
CD108	Activated T cells in spleen, some stromal cells	80	Unknown	GR2	
CD109	Activated T cells, platelets, endothelial cells	170/50	Unknown	Platelet activation factor, GR56	
CD110	Platelets			NPL, TPO R	
CD111	Myeloid Cells			PRR1/Nectin1	
CD112	Myeloid Cells			PRR2	
CD113	For Many of the upper antibodies, between CD114 to CD130 please also see our Interleukin & Growth Factor Receptor Data Pack				
CD114	G-CSF receptor				
CD115	monocytes, macrophages	150	Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)	M-CSFR, c-fms	IgSF

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
			receptor		
CD116	monocytes, neutrophils,eosinophils, endothelium	70-85	Granulocyte, Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) receptor a chain	GM-CSFRa	cytokine receptor superfamily
CD117	hematopoietic progenitors	145	Stem Cell Factor (SCF) receptor	c-kit	IgSF tyrosine kinase
CD118	Broad cellular expression		Interferon a, b receptor	IFNa,bR	
CD119	marophages, monocytes, B cells, endothelium	90-100	Interferon g receptor	IFNgR	
CD120a	hematopoietic and non-hematopoietic cells, highest on epithelial cells	50-60	TNF receptor, binds both TNFa and TNFb	TNFR-I	NFG receptor superfamily
CD120b	hematopoietic and non-hematopoietic cells, highest on myeloid cells	75-85	TNF receptor, binds both TNFa and TNFb	TNFR-II	NFG receptor superfamily
CD121a	thymocytes ,T cells	80	type I interleukin 1 receptor, binds IL-1a and IL-1b	IL-1R type I	IgSF
CDw121b	B cells, macrophages, monocytes	60-70	type II interleukin 1 receptor, binds IL-1a and IL-1b	IL-1R, ytpe II	IgSF
CD122	Natural killer cells, resting T cell subpopulation, some B cell lines	75	IL-2 receptor b chain	IL-2Rb	
CDw123	Bone marrow stem cells, granulocytes, monocytes, megakaryocytes	70	IL-3 receptor a chain	IL-3R	cytokine receptor superfamily fibronectin type III superfamily
CD124	Mature B and T cells, haematopoietic precursor cells	130-150	IL-4 receptor	IL-4R	cytokine receptor superfamily fibronectin type III superfamily
CDw125	Eosinophils, basophils	55-60	IL-5 receptor	IL-5R	cytokine receptor

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
					superfamily fibronectin type III superfamily
CD126	Activated B cells and plsama cells, weak on most leukocytes	80	IL-6 receptor a subunit	IL-6R	IgSF cytokine receptor superfamily fibronectin type III superfamily
CD127	Bone marrow lymphoid precursors, pro-B cells, mature T cells,monocytes	68-79, possibly forms homodimers	IL-7 receptor	IL-7R	fibronectin type III superfamily
CDw128	Neutrophils, basophils, T cell subset	58-67	IL-8 receptor	IL-8R	rhodopsin superfamily
CD129	not yet assigned				
CDw130	Activated B cells and plasma cells; weak on most leukocytes; endothelial cels	130	IL-6 receptor b subunit	IL-6rb	IgSF cytokine receptor superfamily fibronectin type III superfamily
CDw131	monocytes, granulocytes, eosinophils, B cells,	95-120	B and T cell growth	IL-3R common beta chain	
CD132	T and B cells, fibroblasts haematopoietic precursors	64	B and T cell growth	common gamma chain	
CD133	stem/progenitor cells			AC133	
CD134	activated T cells	48-50	adhesion activated T cells;ligand for gp34	OX-40	
CD135	CD34 cells, carcinoma cells	130-150	receptor tyrosine kinase	FLT3/FLK2	
CDw136		180	receptor tyrosine kinase	MSP-R	
CDw137	T cells	30	co-stimulatory T cell activation	4-1BB	
CD138	plasma cells; syndecan 1		ligand for collagen type I	syndecan-1	
CD139					
CD140a		180	PDGFRa		

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
CD140b		180	PDGFRb		
CD141	myeloid cells, endothelial cells, smooth muscle cells	100	myeloid thrombin receptor; regulation of coagulation	Thrombomodulin	
CD142	monocytes, endothelial cells	45	receptor for clotting factor VII, inhibits clotting	Tissue Factor	
CD143	endothelial and epithelial cells	170	peptidyl-peptidase, ACE	Angiotensin converting enzyme (ACE)	
CD144	endothelial cells	135	adhesion molecule;role in cell-cell adhesion	VE-Cadherin	
CDw145	endothelial cells				
CD146	endothelial cells, melanoma cells, follicular dendritic cell	113-118	homing of activated T cells	MUC18, S-endo	
CD147	endothelial cells, myeloid cells, lymphocytes			Neurothelin, basoglin	
CD148				HPTP-eta, p260	
CDw149 (now CD47R)				MEM-133	
CD150	T and B cells	75-95	signalling molecule	SLAM(surface lymphocyte activation marker)	
CD151			PETA-3		
CD152	T cells	44	neg. regul. for T cells co stimul;ligand CD80,86	CTLA-4	
CD153	T cells	40	co-stimulatory for T cells;	CD30L	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
			ligand for CD30		
CD154	T cells	32-39	co-stimulatory molecule; ligand for CD40	CD40L, T-BAM	
CD155			Polio virus receptor (PVR)		
CD156a			ADAM8		
CD156b				ADAM17/TACE	
CD157			MO-5, BST-1		
CD158a	T cells	58/50	inhibition of cytotox; class-I specific NK-receptor	p58.1	
CD158b	T cells	58/50	inhibition of cytotox; class-I specific NK-receptor	p58.2	
CD158c	T cells	55-58	activating molecule;member of Ig superfamily	p58.3	
CD159a	NK cells			NKG2A	
CD160	T cells			BY55	
CD161	NK cells	60	regulation of NK cell-mediated cytotoxicity	NKRP-1A	
CD162	monocytes, granulocytes, T cells, subset of B cells	240	adhesion molecule;leucocyte rolling; ligand P-selectin	P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)	
CD162R	NK cells		PEN5		
CD163			GHI/61, M130		
CD164	myeloid cells, T cells, epithelial cells, bone marrow stroma cells	80	adhesion molecule haem progenitor cells to stroma	MGC-24	
CD165	T cells, NK cells, platelets, thymocytes, thymic epithelium	37	adhesion molecule thymocytes/thymic epithelium	AD2, gp37, A108	
CD166	T cells, NK cells,	100	adhesion	ALCAM	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
	platelets, thymocytes, activated B and T cells, eosinophils, fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes		molecule; ligand for CD6		
CD167a				Discoidin domain R DDR1	
CD168				RHAMM	
CD169				sialoadhesion	
CD170				Siglec-5	
CD171				L1	
CD172a				SIRP Alpha	
CD173				Blood group H type 2	
CD174				Lewis y	
CD175				Tn	
CD175s				Sialyl-Tn	
CD176				TF	
CD177				NB1	
CD178				Fas ligand	
CD179a				Vpre-B	
CD179b				Lambda 5	
CD180				RP105/Bgp95	
CD183				CXCR3	
CD184				CXCR4	
CD195				CCR5	
CDw197				CCR7	
CD200				OX2	
CD201				EPC R	
CD202b				Tie2/Tek	
CD203c				NPP3/PDNP3	
CD204				macrophage scavenger	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
				receptor	
CD205				DEC205	
CD206				macrophage mannose receptor	
CD207				Langerin	
CD208				DC-Lamp	
CD209				DC-SIGN	
CD210				IL-10R	
CD212				IL-12R	
CD213a1				IL-13Ralpha1	
CD213a2				IL-13R alpha 2	
CD217				IL-17R	
CD220			**insulin data pack**	insulin R	
CD221			**insulin data pack**	IGF1R	
CD222				mannose-6-phosphate /IGF2 receptor	
CD223				LAG-3	
CD224				gamma-glutmyl transferase	
CD225				Leu13	
CD226				DNAM-1	
CD227				Muc.1	
CD228				Melanotransferrin	
CD229				Ly9	
CD230				prion protein	
CD231				TALLA-1/A15	

CD antigen	Cellular expression	Molecular weight	Functions	Other names	Family relationships
CD232				VESP R	
CD233				Band 3	
CD234				DARC	
CD235a				Glycophorin A	
CD235b				Glycophorin B	
CD236				Glycophorin C/D	
CD236R				Glycophorin C	
CD238				Kell	
CD239				B-CAM	
CD240CE				Rh30CE	
CD240D				Rh30D	
CD241				RhAg	
CD242				ICAM-4	
CD243				MDR-1	
CD244				2B4	
CD245				p220/240	
CD246				Anaplatic lymphoma kinase	
CD247				zeta chain	

Nuclear Receptors

[409] Nuclear receptors are a superfamily of regulatory proteins that are structurally and functionally related and are receptors for, e.g., steroids, retinoids, vitamin D and thyroid hormones (see, e.g., Evans (1988) Science 240:889-895). These proteins bind to cis-acting elements in the promoters of their target genes and modulate gene expression in response to ligands for the receptors.

[410] Nuclear receptors can be classified based on their DNA binding properties (see, e.g., Evans, supra and Glass (1994) Endocr. Rev. 15:391-407). For example, one class of nuclear receptors includes the glucocorticoid, estrogen, androgen, progestin and mineralocorticoid receptors which bind as homodimers to hormone response elements (HREs) organized as

inverted repeats (see, e.g., Glass, supra). A second class of receptors, including those activated by retinoic acid, thyroid hormone, vitamin D.sub.3, fatty acids/peroxisome proliferators (i.e., peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)) and ecdysone, bind to HREs as heterodimers with a common partner, the retinoid X receptors (i.e., RXRs, also known as the 9-cis retinoic acid receptors; see, e.g., Levin et al. (1992) Nature 355:359-361 and Heyman et al. (1992) Cell 68:397-406).

[411] RXRs are unique among the nuclear receptors in that they bind DNA as a homodimer and are required as a heterodimeric partner for a number of additional nuclear receptors to bind DNA (see, e.g., Mangelsdorf et al. (1995) Cell 83:841-850). The latter receptors, termed the class II nuclear receptor subfamily, include many which are established or implicated as important regulators of gene expression. There are three RXR genes (see, e.g., Mangelsdorf et al. (1992) Genes Dev. 6:329-344), coding for RXRa, -.beta., and -.gamma., all of which are able to heterodimerize with any of the class II receptors, although there appear to be preferences for distinct RXR subtypes by partner receptors in vivo (see, e.g., Chiba et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17:3013-3020). In the adult liver, RXRa is the most abundant of the three RXRs (see, e.g., Mangelsdorf et al. (1992) Genes Dev. 6:329-344), suggesting that it might have a prominent role in hepatic functions that involve regulation by class II nuclear receptors. See also, Wan et al. (2000) Mol. Cell. Biol 20:4436-4444.

Orphan Nuclear Receptors

[412] Included in the nuclear receptor superfamily of regulatory proteins are nuclear receptors for whom the ligand is known and those which lack known ligands. Nuclear receptors falling in the latter category are referred to as orphan nuclear receptors. The search for activators for orphan receptors has led to the discovery of previously unknown signaling pathways (see, e.g., Levin et al., (1992), supra and Heyman et al., (1992), supra). For example, it has been reported that bile acids, which are involved in physiological processes such as cholesterol catabolism, are ligands for the farnesoid X receptor (infra).

[413] Since it is known that products of intermediary metabolism act as transcriptional regulators in bacteria and yeast, such molecules may serve similar functions in higher organisms (see, e.g., Tomkins (1975) Science 189:760-763 and O'Malley (1989) Endocrinology 125:1119-1120). For example, one biosynthetic pathway in higher eukaryotes is the mevalonate pathway, which leads to the synthesis of cholesterol, bile acids, porphyrin, dolichol, ubiquinone, carotenoids, retinoids, vitamin D, steroid hormones and farnesylated proteins.

Farnesoid X Receptor

[414] The farnesoid X receptor (originally isolated as RIP14 (retinoid X receptor-interacting protein-14), see, e.g., Seol et al. (1995) Mol. Endocrinol. 9:72-85) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily and is primarily expressed in the liver, kidney and intestine (see, e.g., Seol et al., supra and Forman et al. (1995) Cell 81:687-693). It functions as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) and binds to response elements in the promoters of target genes to regulate gene transcription. The farnesoid X receptor-RXR heterodimer binds with highest affinity to an inverted repeat-1 (IR-1) response element, in which consensus receptor-binding hexamers are separated by one nucleotide. The farnesoid X receptor is part of an interrelated process, in that the receptor is activated by bile acids (the end product of cholesterol metabolism) (see, e.g., Makishima et al. (1999) Science 284:1362-1365, Parks et al. (1999) Science 284:1365-1368, Wang et al. (1999) Mol. Cell. 3:543-553), which serve to inhibit cholesterol catabolism. See also, Urizar et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:39313-39317.

Nuclear Receptors and Disease

[415] Nuclear receptor activity, including the farnesoid X receptor and/or orphan nuclear receptor activity, has been implicated in a variety of diseases and disorders, including, but not limited to, hyperlipidemia and hypercholesterolemia, and complications thereof, including without limitation coronary artery disease, angina pectoris, carotid artery disease, strokes, cerebral arteriosclerosis and xanthoma, (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 00/57915), osteoporosis and vitamin deficiency (see, e.g., U.S. Pat. No. 6,316,5103), hyperlipoproteinemia (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 01/60818), hypertriglyceridemia, lipodystrophy, peripheral occlusive disease, ischemic stroke, hyperglycemia and diabetes mellitus (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 01/82917), disorders related to insulin resistance including the cluster of disease states, conditions or disorders that make up "Syndrome X" such as glucose intolerance, an increase in plasma triglyceride and a decrease in high-density lipoprotein cholesterol concentrations, hypertension, hyperuricemia, smaller denser low-density lipoprotein particles, and higher circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1, atherosclerosis and gallstones (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 00/37077), disorders of the skin and mucous membranes (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 6,184,215 and 6,187,814, and International Patent Application Publication No. WO 98/32444), obesity, acne (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 00/49992), and cancer,

cholestasis, Parkinson's disease and Alzheimer's disease (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 00/17334).

[416] The activity of nuclear receptors, including the farnesoid X receptor and/or orphan nuclear receptors, has been implicated in physiological processes including, but not limited to, triglyceride metabolism, catabolism, transport or absorption, bile acid metabolism, catabolism, transport, absorption, re-absorption or bile pool composition, cholesterol metabolism, catabolism, transport, absorption, or re-absorption. The modulation of cholesterol 7.alpha.-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription (see, e.g., Chiang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:10918-10924), HDL metabolism (see, e.g., Urizar et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:39313-39317), hyperlipidemia, cholestasis, and increased cholesterol efflux and increased expression of ATP binding cassette transporter protein (ABC1) (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO 00/78972) are also modulated or otherwise affected by the farnesoid X receptor.

Nuclear Receptor Ligands (NRLs)

[417] Nuclear hormone receptors can be divided into four mechanistic classes: Type I, Type II, Type III, and Type IV. Ligand binding to Type I receptors (NR3 Group) results in the dissociation of heat shock proteins (HSP) from the receptor, homodimerization of the receptor, translocation from the cytoplasm into the cell nucleus, and binding to inverted repeat hormone response elements (HRE's) of DNA. The nuclear receptor/DNA complex then recruits other proteins which transcribe DNA downstream from the HRE into messenger RNA. Type II receptors (NR1 Group) are retained in the nucleus and bind as heterodimers, usually with Retinoid X Receptors (RXR), to DNA. Type II nuclear hormone receptors are often complexed with corepressor proteins. Ligand binding to the Type II receptor causes dissociation of the corepressor and recruitment of coactivator proteins. Additional proteins are recruited to the

nuclear receptor/DNA complex, which transcribe DNA into messenger RNA. Type III nuclear hormone receptors (NR2 Group) are orphan receptors that bind to direct repeat HRE's of DNA as homodimers. Type IV nuclear hormone receptors bind to DNA either as monomers or dimers. Type IV receptors are unique because a single DNA binding domain of the receptor binds to a single half site HRE. The NHR ligand can be a ligand that acts at any one or more of the Type I, Type II, Type III or Type IV nuclear hormone receptors (e.g. as an agonist or antagonist).

Table l. Nuclear Receptors

Group	Genes	Trivial Names	Accession
1A	NR1A1	TR*a*, c-erbA-1, THRA	M24748
	NR1A2	TR*b*, c-erbA-2, THRB	X04707
1B	NR1B1	RAR*a*	X06538
	NR1B2	RAR*b*, HAP	Y00291
	NR1B3	RARg, RARD	M57707
1C	NR1C1	PPAR*a*	L02932
	NR1C2	PPAR*b*, NUC1, PPAR*d*, FAAR	L07592
	NR1C3	PPARg	L40904
1D	NR1D1	REVERB*a*, EAR1, EAR1A	M24898
	NR1D2	REVERB*b*, EAR1*b*, BD73, RVR, HZF2	L31785
1F	NR1F1	ROR*a*, RZR*a*	U04897
	NR1F2	ROR*b*, RZR*b*	Y08639
	NR1F3	RORg, TOR	U16997
1H	NR1H2	UR, OR-1, NER1, RIP15, LXR*b*	U07132
	NR1H3	RLD1, LXR, LXR*a*	U22662
	NR1H4	FXR, RIP14, HRR1	U09416
1I	NR1I1	VDR	J03258
	NR1I2	ONR1, PXR, SXR, BXR	X75163
	NR1I3	MB67, CAR1, CAR*a*	Z30425
		CAR3 (splice variant)	
2A	NR2A1	HNF4	X76930
	NR2A2	HNF4G	Z49826
2B	NR2B1	RXRA	X52773
	NR2B2	RXRB, H-2RIIBP, RCoR-1	M84820
	NR2B3	RXRG	X66225
	NR2B4	USP, Ultraspiracle, 2C1, CF1, RXR1, RXR2	X52591
2C	NR2C1	TR2, TR2-11	M29960
2E	NR2E1	TLL, TLX, XTLL	S72373
	NR2E3	PNR	AF121129
2F	NR2F1	COUP-TFI, COUPTFA, EAR3, SVP44	X12795
	NR2F2	COUP-TFII, COUPTFB, ARP1, SVP40	M64497
	NR2F6	EAR2	X12794
3A	NR3A1	Era	X03635
	NR3A2	ERb	U57439
3B	NR3B1	ERR1, ERRa	X51416
	NR3B2	ERR2, ERRb	X51417

Group	Genes	Trivial Names	Accession
	NR3B3	ERR3, ERRg	AF094318
3C	NR3C1	GR	X03225
	NR3C2	MR	M16801
	NR3C3	PR	M15716
	NR3C4	AR	M20132
4A	NR4A1	NGFIB, TR3, N10, NUR77, NAK1	L13740
	NR4A2	NURR1, NOT, RNR1, HZF-3, TINOR	X75918
	NR4A3	NOR1, MINOR	D38530
5A	NR5A1	SF1, ELP, FTZ-F1, AD4BP	D88155
	NR5A2	LRH1, xFF1rA, xFF1rB, FFLR, PHR, FTF	U93553
6A	NR6A1	GCNF1, RTR	U14666
0B	NR0B1	DAX1, AHCH	S74720
	NR0B2	SHP	L76571

[418] In some embodiments, **Y** is an antagonist that acts by competing with or blocking binding of native or non-native ligand to the active site. In some embodiments, the NRL is an antiandrogenic compound. In certain embodiments, the antiandrogenic NRL is selected from the group consisting of antiandrogens; alpha-substituted steroids; carbonylamino-benzimidazole; 17-hydroxy 4-aza androstan-3-ones; antiandrogenic biphenyls; goserelin; nilutamid; decursin; flutamide; p,p'-DDE; vinclozolin; cyproterone acetate; linuron. In certain embodiments, the antiandrogenic NRL is selected from the group consisting of fluorinated 4-azasteroids; fluorinated 4-azasteroids derivatives; antiandrogens; alpha-substituted steroids; carbonylamino-benzimidazole; 17-hydroxy 4-aza androstan-3-ones; antiandrogenic biphenyls; goserelin; nilutamid; decursin; flutamide; p,p'-DDE; vinclozolin; cyproterone acetate; and linuron. In other embodiments, the NRL is an antagonist that acts by binding to the active site or an allosteric site and preventing activation of, or de-activating, the NR.

[419] In some embodiments, **Y** exhibits an ECso for nuclear receptor activation (or in the case of an antagonist, an IC50) of about 10 mM or less, or 1 mM (1000 μM) or less (e.g., about 750 μM or less, about 500 μM or less, about 250 μM or less, about 100 μM or less, about 75 μM or less, about 50 μM or less, about 25 μM or less, about 10 μM or less, about 7.5 μM or less, about 6 μM or less, about 5 μM or less, about 4 μM or less, about 3 μM or less, about 2 μM or less or about 1 μM or less). In some embodiments, Y exhibits an EC50 or IC50 at a nuclear hormone receptor of about 1000 nM or less (e.g., about 750 nM or less,

about 500 nM or less, about 250 nM or less, about 100 nM or less, about 75 nM or less, about 50 nM or less, about 25 nM or less, about 10 nM or less, about 7.5 nM or less, about 6 nM or less, about 5 nM or less, about 4 nM or less, about 3 nM or less, about 2 nM or less or about 1 nM or less). In some embodiments, Y has an EC_{50} or IC_{50} at a nuclear hormone receptor which is in the picomolar range. Accordingly, in some embodiments, Y exhibits an EC_{50} or IC_{50} at a nuclear hormone receptor of about 1000 pM or less (e.g., about 750 pM or less, about 500 pM or less, about 250 pM or less, about 100 pM or less, about 75 pM or less, about 50 pM or less, about 25 pM or less, about 10 pM or less, about 7.5 pM or less, about 6 pM or less, about 5 pM or less, about 4 pM or less, about 3 pM or less, about 2 pM or less or about 1 pM or less).

[420] In some embodiments, Y exhibits an EC_{50} or IC_{50} at a nuclear hormone receptor that is about 0.001 pM or more, about 0.01 pM or more, or about 0.1 pM or more. Nuclear hormone receptor activation (nuclear hormone receptor activity) can be measured *in vitro* by any assay known in the art. For example, the activity at the nuclear hormone receptor can be measured by expressing the receptor in yeast cells also harboring a reporter gene (e.g., *lacZ* which encodes β-galactosidase) under the control of a hormone-responsive promoter. Thus, in the presence of a ligand that acts at the receptor, the reporter gene is expressed and the activity of the reporter gene product can be measured (e.g., by measuring the activity of β-galactosidase in breaking down a chromogenic substrate, such as chlorophenol red- -D-galactopyranoside (CPRG), which is initially yellow, into a red product that can be measured by absorbance). See, e.g., Jungbauer and Beck, *J. Chromatog. B*, 77: 167-178 (2002); Routledge and Sumpter, *J. Biol. Chem*, 272: 3280-3288 (1997); Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 274: 26654-26660 (1999). Binding of the NHR ligand to the nuclear hormone receptor can be determined using any binding assay known in the art such as, for example, fluorescence polarization or a radioactive assay. See, e.g., Ranamoorthy et al., 138(4): 1520-1527 (1997).

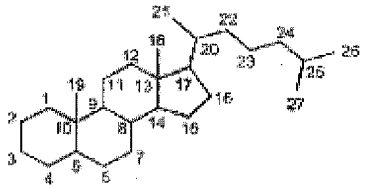
[421] In some embodiments, Y exhibits about 0.001% or more, about 0.01% or more, about 0.1% or more, about 0.5% or more, about 1% or more, about 5% or more, about 10% or more, about 20% or more, about 30% or more, about 40% or more, about 50% or more, about 60% or more, about 75% or more, about 100% or more, about 125% or more, about 150% or more, about 175% or more, about 200% or more, about 250% or more, about 300% or more, about 350% or more, about 400% or more, about 450% or more, or about 500% or higher activity at the nuclear hormone receptor relative to the native nuclear hormone (nuclear hormone potency). In some embodiments, Y exhibits about 5000% or less or about 10,000%

or less activity at the nuclear hormone receptor relative to native nuclear hormone. The activity of Y at a receptor relative to a native ligand of the receptor is calculated as the inverse ratio of EC50S for Y versus the native ligand. In some embodiments, Y is the native ligand of the receptor.

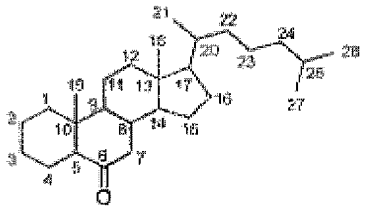
[422] The NRL of the invention (Y) is partly or wholly non-peptidic and is hydrophobic or lipophilic. In some embodiments, the NHR ligand has a molecular weight that is about 5000 daltons or less, or about 4000 daltons or less, or about 3000 daltons or less, or about 2000 daltons or less, or about 1750 daltons or less, or about 1500 daltons or less, or about 1250 daltons or less, or about 1000 daltons or less, or about 750 daltons or less, or about 500 daltons or less, or about 250 daltons or less. The structure of Y can be in accordance with any of the teachings disclosed herein.

[423] In the embodiments described herein, Y is conjugated to L (e.g. when L is a linking group) or Ab (e.g. when L is a bond) at any position of Y that is capable of reacting with Ab or L. One skilled in the art could readily determine the position and means of conjugation in view of general knowledge and the disclosure provided herein.

[424] In any of the embodiments described herein wherein Y comprises a tetracyclic skeleton having three 6-membered rings joined to one 5-membered ring or a variation thereof (e.g. a Y that acts at the vitamin D receptor), the carbon atoms of the skeleton are referred to by position number, as shown below:



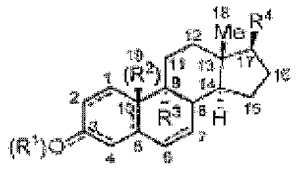
For example, a modification having a ketone at position-6 refers to the following structure:



[425] In some embodiments of the invention, the NRL (Y) acts on a Type I nuclear hormone receptor. In some embodiments, Y can have any structure that permits or promotes agonist activity upon binding of the ligand to a Type I nuclear hormone receptor, while in other embodiments Y is an antagonist of the Type I nuclear hormone receptor.

[426] In some embodiments of the invention, the NHR ligand (Y) acts on a Type I nuclear hormone receptor. In some embodiments, Y can have any structure that permits or promotes agonist activity upon binding of the ligand to a Type I nuclear hormone receptor, while in other embodiments Y is an antagonist of the Type I nuclear hormone receptor.

[427] In exemplary embodiments, Y comprises a structure as shown in Formula A:



wherein R 1 and R 2 , when present, are independently moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula A to the Type I nuclear hormone receptor; R^3 and R^4 are independently moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula A to the Type I nuclear hormone receptor; and each dashed line represents an optional double bond. Formula A may further comprise one or more substituents at one or more of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, and 19. Contemplated optional substituents include, but are not limited to, OH, NH_2, ketone, and C1-C18 alkyl groups.

[428] In some embodiments, Y comprises a structure of Formula A wherein

R^1 is present and is hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1.C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OCi_Ci_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2.Ci_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2_Ci_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)0 heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$.C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, or SO_3H;

R^2 is present and is hydrogen, (Co-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0- C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (Co-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8

alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-Ci_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C $_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(0)OH;

R^3 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1.C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1.C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2.C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2.C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2.C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_1$.C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_2$.C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1.C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C $_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{Z4}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^4 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2.C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-

C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)C_2$-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)OH$, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OH$; and

R 24 is hydrogen or C_1-C_{18} alkyl.

[429] In some embodiments, Y comprises a structure of Formula A

wherein R^1 is present and is hydrogen, C1-C7 alkyl; (C_0-C_3 alkyl)C(O)C_1-C_7 alkyl, (C_0-C_3 alkyl)C(O)aryl, or SO_3H;

R is present and is hydrogen, halo, OH, or Ci-C_7 alkyl;

R is hydrogen, halo, OH, or C_1-C_7 alkyl;

R^4 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_8 alkenyl, C_{2-18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (Co-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1- C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1- C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8

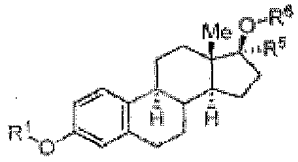
alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(0)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}O)OC_2-C_8 alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH; and,

R^{24} is hydrogen or C1-C7 alkyl.

[430] In some embodiments, R^1 is hydrogen, propionate, acetate, benzoate, or sulfate; R^2 is hydrogen or methyl; R^3 is hydrogen or methyl; and R^4 is acetate, cypionate, hemisuccinate, enanthate, or propionate.

[431] In embodiments wherein Y comprises a structure of Formula A, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula A that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula A and means of conjugation of Formula A to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula A is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 of Formula A. In some embodiments, Formula A is conjugated to **L** or **Ab** at position 1, 3, 6, 7, 12, 10, 13, 16, 17, or 19 of Formula A.

[432] In some embodiments, **Y** acts at an estrogen receptor (e.g. ERα, ERβ). In some embodiments, **Y** permits or promotes agonist activity at the estrogen receptor, while in other embodiments **Y** is an antagonist of ER. In exemplary embodiments, **Y** can have a structure of Formula B :



wherein R^1, R^5 and R^6 are moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula B to the estrogen receptor. In some embodiments, Formula B further comprises one or more substitutents at one or more of positions 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, and 16 (e.g. a ketone at position-6).

[433] In some embodiments when **Y** comprises a structure of Formula B, wherein

R^1 is hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_2$_Ci_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_2$_Ci_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, or SO_3H;

R^5 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OCi_Ci_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(0)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)OC_2-C $_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C $_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(0)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C ig alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH; (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1- C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-Cig alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8

alkyl)OC(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(0)C_2-C $_8$ alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH;

R^6 is hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (Co-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, or SO_3H; and,

R 24 is hydrogen or C_1-C_{18} alkyl.

[434] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula B, wherein

R^1 is hydrogen, C_1-C_7 alkyl; (C_0-C_3 alkyl)C(O)C_1-C_7 alkyl, (C_0-C_3 alkyl)C(0)aryl, or $S0_3H$;

R^5 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1- C_8 alkyl, C_2-C_8 alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1- C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2_C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1- C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8

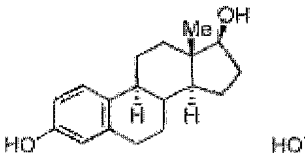
alkyl)OC(O)NR^{24}C$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_2$.C$_8$ alkynyl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^6 is hydrogen, C$_1$-C$_8$ alkyl, C$_2$-C$_8$ alkenyl, C$_2$-C$_8$ alkynyl, heteroalkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)H, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OH, C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}aryl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl; and

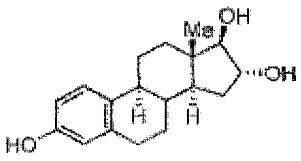
R^{24} is hydrogen or C$_1$-C$_7$ alkyl.

[435] For example, R^1 is hydrogen, propionate, acetate, benzoate, or sulfate; R^5 is hydrogen, ethynyl, hydroxyl; and R^6 is acetate, cypionate, hemisuccinate, enanthate, or propionate.

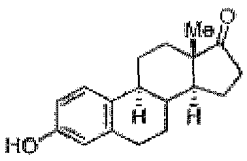
[436] Nonlimiting examples of the compound of Formula B include 17β-estradiol, modified forms of estradiol such as β-estradiol 17-acetate, β-estradiol 17-cypionate, β-estradiol 17-enanthate, β-estradiol 17-valerate, β-estradiol 3,17-diacetate, β-estradiol 3,17-dipropionate, β-estradiol 3-benzoate, β-estradiol 3-benzoate 17-n-butyrate, β-estradiol 3-glycidyl ether, β-estradiol 3-methyl ether, β-estradiol 6-one, β-estradiol 3-glycidyl, β-estradiol 6-one 6-(O-carboxymethyloxime), 16-epiestriol, 17-epiestriol, 2-methoxy estradiol, 4-methoxy estradiol, estradiol 17-phenylpropionate, and 17β-estradril 2-methyl ether, 17a-ethynylestradiol, megestrol acetate, estriol, and derivatives thereof. In some embodiments, carbon 17 has a ketone substitutent and R^5 and R^6 are absent (e.g. estrone). Some of the aforementioned compounds of Formula B are shown below:



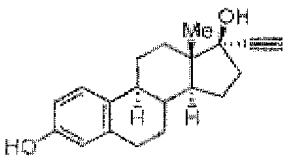
Estradiol



Estriol



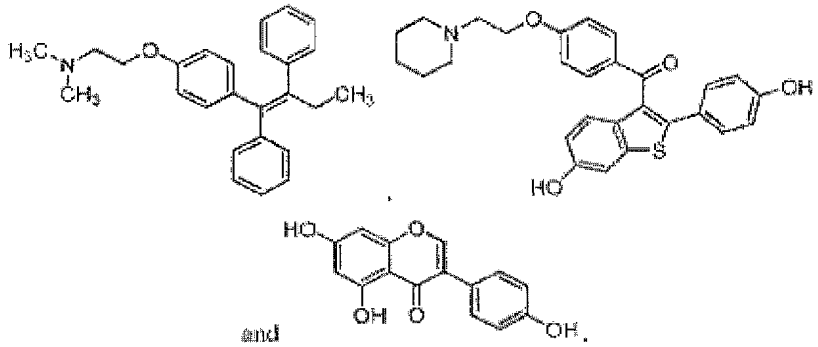
Estrone



Ethylyl estradriol

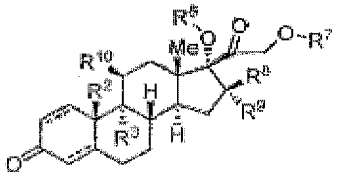
[437] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula B, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula B that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula B and means of conjugation of Formula B to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula B is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 of Formula B. In some embodiments, Formula B is conjugated to **L** or **Ab** at position 3 or 17 of Formula B.

[438] In other embodiments, **Y** acts at an estrogen receptor but is not encompassed by Formula B. Nonlimiting examples of ligands that act at an estrogen receptor that are not encompassed by Formula B are shown below:



and

[439] In some embodiments, **Y** acts at a glucocorticoid receptor (GR). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the GR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of GR. In exemplary embodiments, **Y** comprises a structure of Formula C:



wherein R^2, R^3, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} are each independently moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon the binding of the compound of Formula C to the GR; and each dash respresents an optional double bond. In some embodiments, Formula C further comprises one or more substituents at one or more of positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, and 15 (e.g. hydroxyl or ketone at position-11).

[440] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula C wherein

R^2 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C $_8$ alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^3 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8

alkyl)$NR^{24}C(O)C_2$-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(0)C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)OH$, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$OC(O)NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OH$;

R^6 is hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (Co-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}$aryl, or (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}$heteroaryl ;

R^7 is hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}$aryl, or (C_0-C_8 alkyl)$C(O)NR^{24}$heteroaryl ;

R^8 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1.C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl;

R^9 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1.C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl;

R^{10} is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1.C_{18} alkyl, or (C_0-C_8 alkyl)OH; and

R^{24} is hydrogen or C_1-C_{18} alkyl.

[441] In some embodiments, Y comprises a structure of Formula C, wherein

R^2 is hydrogen, halo, OH, or C_1-C_7 alkyl;

R^3 is hydrogen, halo, OH, or C_1-C_7 alkyl;

R^6 is hydrogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_8 alkenyl, C_2-C_8 alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, or (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl ;

R^7 is hydrogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_8 alkenyl, C_2-C_8 alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0 alkyl)C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0)C(O)aryl, (C_0)C(O)heteroaryl, (C_0)C(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkynyl, or (C_0 alkyl)C(O)OH;

R^8 is hydrogen or C_1-C_7 alkyl;

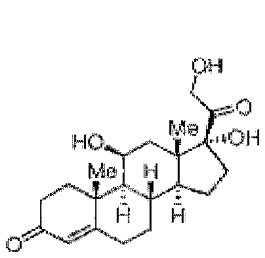
R^9 is hydrogen or C_1-C_7 alkyl;

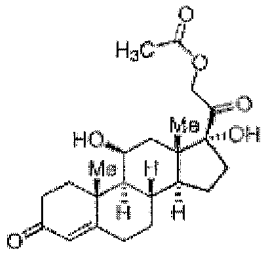
R^{10} hydrogen or OH; and

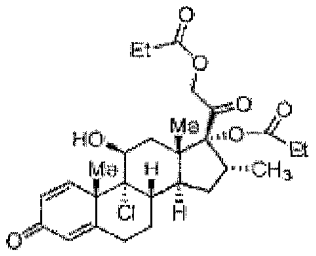
R^{24} is hydrogen or C_1-C_7 alkyl.

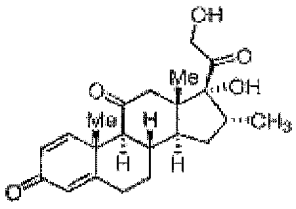
[442] For example, R^2 is hydrogen or methyl; R^3 is hydrogen, fluoro, chloro, or methyl; R^6 is hydrogen or C(O) C_1-C_7 alkyl; R^7 is hydrogen, C(O)CH_3, or C(O)CH_2CH_3; R^8 is hydrogen or methyl; R^9 is hydrogen or methyl; and R^{10} is hydroxyl.

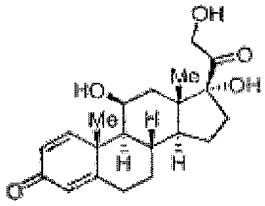
[443] Nonlimiting examples of structures of Formula C include:

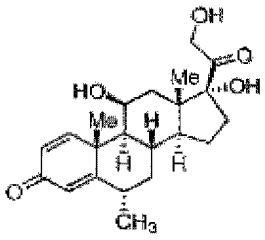

Cortisol

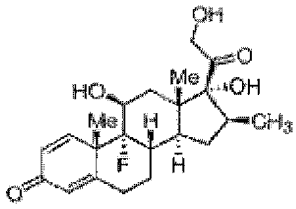

Cortisone acetate

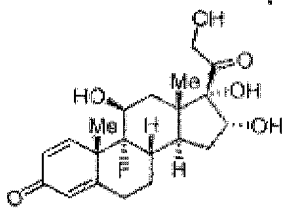

Beclometasone

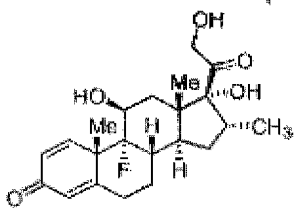

Prednisone


Prednisolone


Methylprednisolone


Betamethasone

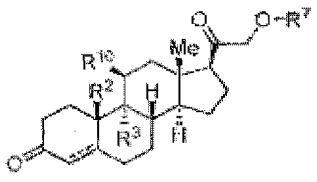

Triamcinolone


Dexamethasone

and derivatives thereof.

[444] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula C, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula C that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula C and means of conjugation of Formula C to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula C is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, or 23 of Formula C. In some embodiments, Formula C is conjugated to **L** or **Ab** at position 3, 10, 16 or 17 of Formula C.

[445] In some embodiments, Y acts at a mineralcorticoid receptor (MR). In some embodiments, Y comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the MR, while in other embodiments Y is an antagonist of MR. In exemplary embodiments, Y comprises a structure of Formula D:



wherein R^2, R^3,R^7 and R^{10} are each independently a moiety that permits or promotes agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula D to the MR; and the dashed line indicates an optional double bond. In some embodiments, Formula D further comprises one or more substituents at one or more of positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, and 17.

[446] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula D wherein

R^2 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^3 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8

alkyl)C(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(0)OH, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(0)C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(O)C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(O)C$_2$-C$_8$ alkenyl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(0)C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OC$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OH, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^7 is hydrogen, C$_1$-C$_{18}$ alkyl, C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, heteroalkyl, (Co-C$_8$ alkyl)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)H, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OH, C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}aryl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl ;

R^{10} is hydrogen, (C$_0$-C$_8$ alkyl)halo, C$_1$-C$_{18}$ alkyl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)OH; and

R^{24} is hydrogen or C$_1$-C$_{18}$ alkyl.

[447] In some embodiments, Y comprises a structure of Formula D, wherein

R is hydrogen, halo, OH, or C$_1$-C$_7$ alkyl;

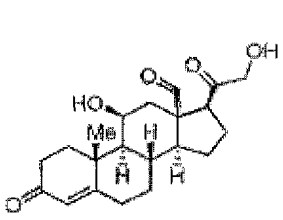
R is hydrogen, halo, OH, or C$_1$-C$_7$ alkyl;

R is hydrogen, C$_1$-C$_8$ alkyl, C$_2$-C$_8$ alkenyl, C$_2$-C$_8$ alkynyl, heteroalkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)aryl, (Co-C$_8$ alkyl)heteroaryl, (C$_0$ alkyl)C(O)C$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$)C(O)aryl, (C$_0$)C(O)heteroaryl, (C$_0$)C(O)OC$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$ alkyl)C(O)OC$_2$.C$_8$ alkynyl, or (C$_0$ alkyl)C(O)OH;

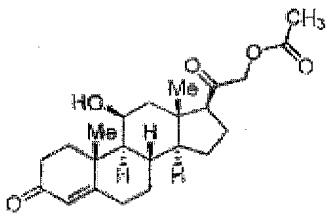
R^{10} is hydrogen or OH; and

R^{24} is hydrogen or C$_1$-C$_7$ alkyl.

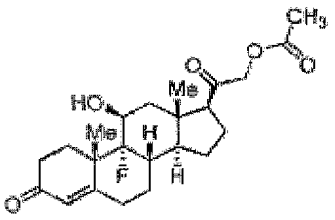
[448] For example, R is hydrogen or methyl; R is hydrogen, fluoro, chloro, or methyl; R is hydrogen, $C(0)CH_3$, or $C(0)CH_2CH_3$; and R^{10} is hydroxyl. Nonlimiting examples of compounds of Formula D include:



Aldosterone



Deoxycorticosterone acetate

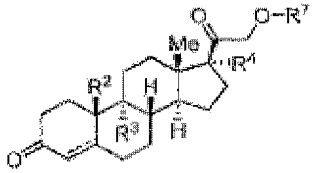


Deoxycorticosterone acetate

and derivatives thereof.

[449] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula D, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula D that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula D and means of conjugation of Formula D to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula D is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, or 24 of Formula D. In some embodiments, Formula D is conjugated to **L** or **Ab** at position 3, 10, 13, or 17 of Formula D.

[450] In some embodiments, **Y** acts at a progesterone receptor (PR). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the PR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of PR. In exemplary embodiments, **Y** comprises a structure of Formula E:



wherein R^2, R^3, R^4, and R^7 are each independently moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula E to the PR; and the dashed line indicates an optional double bond. In some embodiments, Formula E further comprises one or more substituents at one or more of positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, and 17 (e.g. a methyl group at position 6).

[451] In some embodiments, Y comprises a structure of Formula E wherein

R^2 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-

C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH; R^{24} is hydrogen or C_1-C_{18} alkyl.

R^3 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18}

alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}$$C_1$-$C_{18}$ alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^4 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)N$R^{24}$$C_1$-$C_{18}$ alkyl, (C_0-C_8 alkyl)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)N$R^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OCi_Ci$_8$ alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}$$C_1$-$C_{18}$ alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)NR^{24} C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}$$C_1$-$C_{18}$ alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)N$R^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^7 is hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}$$C_1$-$C_{18}$ alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)N$R^{24}$$C_2$-$C_{18}$ alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)N$R^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, or (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl; and

R^{24} is hydrogen or C_1-C_{18} alkyl.

[452] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula E, wherein

R^2 is hydrogen, halo, OH, or C_1-C_7 alkyl;

R^3 is hydrogen, halo, OH, or C_1-C_7 alkyl;

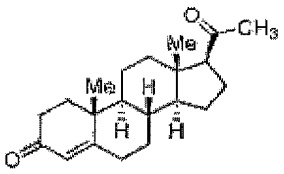
R^4 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_8 alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_20C_8$ alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_20C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{Z4}C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_8 alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_8 alkenyl, (Co-C_8 alkyl)NR^{24}(0)OC_2-C_8 alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^7 is hydrogen, C_1-C_8 alkyl, C_2-C_8 alkenyl, C_2-C_8 alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (Co-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0 alkyl)C(O)C_1-C_8 alkyl, (C_0 alkyl)C(O)C_2-C_8 alkenyl, (Co alkyl)C(O)C_2-C_8 alkynyl, (C_0)C(O)aryl, (C_0)C(O)heteroaryl, (C_0)C(O)OC_1-C_8 alkyl, (C_0 alkyl)C(O)OC_2-C_8 alkenyl, (C_0 alkyl)C(O)OC_2_C_8 alkynyl, or (C_0 alkyl)C(O)OH; and

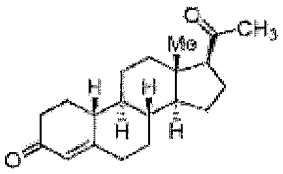
R^{24} is hydrogen or C_1-C_7 alkyl.

[453] For example, R^2 is hydrogen or methyl; R^3 is hydrogen or methyl; R^4 is (C_1 alkyl)C(O)C_1-C4 alkyl, acetate, cypionate, hemisuccinate, enanthate, or propionate; and R^7 is hydrogen, $C(O)CH_3$, or $C(O)CH_2CH_3$.

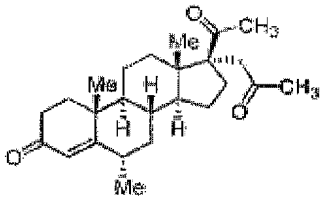
[454] Nonlimiting examples of compounds of Formula E include:



Progesterone



19-nor-progesterone

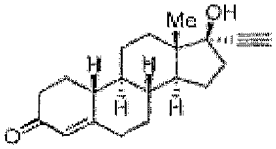


Medroxyprogesterone

and derivatives thereof.

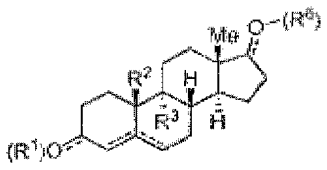
[455] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula E, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula E that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula E and means of conjugation of Formula E to Ab or L in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula E is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, or 24 of Formula E. In some embodiments, Formula E is conjugated to **L** or **Ab** through position 3 or 17 of Formula E.

[456] In other embodiments, **Y** acts at a progesterone receptor but is not is not encompassed by Formula E. For example, **Y** can comprise the below structure and analogs thereof:



Norethidrone

[457] In some embodiments, Y acts at an androgen receptor (AR). In some embodiments, Y comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the AR, while in other embodiments Y is an antagonist of AR. In exemplary embodiments, Y comprises a structure of Formula F:



wherein R^1, when present, R^2, R^3 and R^6 are each independently a moiety that permits or promotes agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula F to the AR; and each dashed line represents an optional double bond, with the proviso that no more than one of the optional carbon-carbon double bond is present at position 5. In

some embodiments, Formula F further comprises one or more substituents at one or more of positions 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, and 17.

[458] In some embodiments, Y comprises a structure of Formula F wherein

R^2 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C $_8$ alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OC_2-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^3 is hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_0-C_8 alkyl)aryl, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)SH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(0)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8

alkyl)C(O)NR^{24}C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(O)C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(O)C$_2$-C$_8$ alkenyl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(0)C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}C(O)OH, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OC$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)OH, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)OC(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)NR^{24}(O)OH;

R^6 is hydrogen, C$_1$-C$_{18}$ alkyl, C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, heteroalkyl, (Co-C$_8$ alkyl)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)H, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OH, C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_1$-C$_{18}$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_{18}$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl , or SO$_3$H; and

R^{24} is hydrogen or C$_1$-C$_{18}$ alkyl.

[459] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula E,

wherein R^1 is hydrogen, C$_1$-C$_7$ alkyl; (C$_0$-C$_3$ alkyl)C(O)C$_1$-C$_7$ alkyl, (C$_0$-C$_3$ alkyl)C(O)aryl, or S0$_3$H;

R is hydrogen, halo, OH, or C$_1$-C$_7$ alkyl;

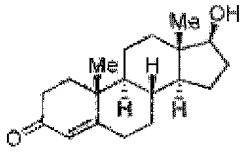
R is hydrogen, halo, OH, or C$_1$-C$_7$ alkyl;

R^6 is hydrogen, C$_1$-C$_8$ alkyl, C$_2$-C$_8$ alkenyl, C$_2$-C$_8$ alkynyl, heteroalkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)C$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)H, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OC$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)OH, C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O aryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)O heteroaryl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_1$-C$_8$ alkyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_8$ alkenyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}C$_2$-C$_8$ alkynyl, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}H$_2$, (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}aryl, or (C$_0$-C$_8$ alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl; and

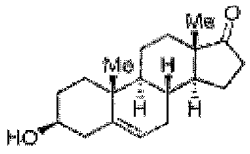
R^{24} is hydrogen or C_1-C_7 alkyl.

[460] For example, R^1 is hydrogen or absent; R^2 is hydrogen or methyl; R^3 is hydrogen or methyl; and R^6 is H or absent.

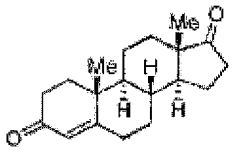
[461] Nonlimiting examples of compounds of Formula F include:



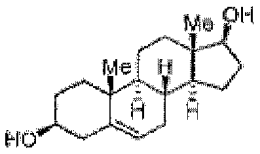
Testosterone,



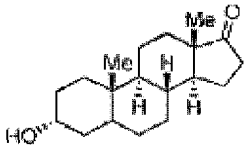
Dehydroepiandrosterone,



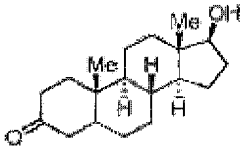
Androstenedione,



5-Androstenediol,



Androsterone,



Dihydrotestosterone,

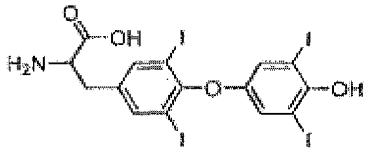
and derivatives thereof.

[462] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula F, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula F that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula F and means of conjugation of Formula F to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula F is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, or 22 of Formula F. In some embodiments, Formula F is conjugated to **L** or **Ab** at position 3 or 17 of Formula F.

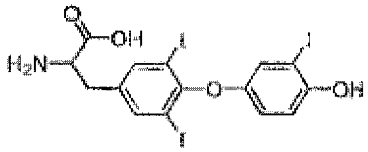
[463] In some embodiments, the binding of the NRL to the Type I nuclear hormone receptor results in agonist activity (or antagonist activity) in some but not all cells or tissues expressing the Type I nuclear hormone receptor.

[464] In some embodiments of the invention, the NRL (**Y**) acts on a Type II nuclear hormone receptor. In some embodiments, **Y** can have any structure that permits or promotes agonist activity upon binding of the ligand to a Type II nuclear hormone receptor, while in other embodiments **Y** is an antagonist of the Type II nuclear hormone receptor. In exemplary embodiments, **Y** exhibits agonist (or antagonist) activity at a thyroid hormone receptor (TR), retinoic acid receptor (RAR), peroxisome proliferator activated receptor (PPAR), Liver X Receptor (LXR), farnesoid X receptor (FXR), vitamin D receptor (VDR), and/or pregnane X receptor (PXR).

[465] In some embodiments, Y acts at a thyroid hormone receptor (e.g. TRa, TR). In some embodiments, Y comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the TR, while in other embodiments Y is an antagonist of TR. Nonlimiting examples of Y include the following compounds:



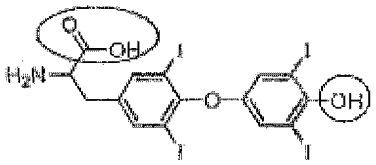
Thyroxine (T_4),



Triiodothyroxine (T_3),

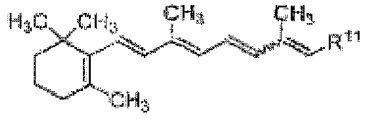
and derivatives thereof.

[466] In embodiments wherein **Y** comprises a structure that permits or promotes agonist or antagonist activity at a TR, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of **Y** that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on **Y** and means of conjugation of **Y** to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** through any position of **Y**. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** through the carboxylic acid or alcohol moieties, as indicated below:



Thyroxine

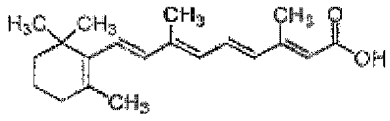
[467] In some embodiments, **Y** acts at a retinoic acid receptor (e.g. RARα, RARβ, RARγ). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the RAR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of RAR. In exemplary embodiments, **Y** comprises a structure of Formula G:

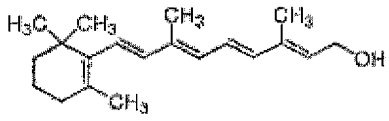


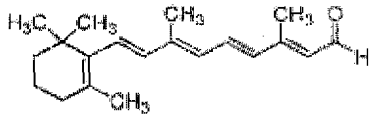
wherein R^{11} is a moiety that permits or promotes agonist or antagonist activity upon the binding of the compound of Formula G to a RAR, and ~~~~ represents either *E* or *Z* stereochemistry.

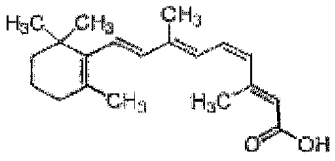
[468] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula G wherein R^{11} is C(O)OH, CH_2OH, or C(O)H. In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula G wherein R^{11} is a carboxylic acid derivative (e.g. acyl chloride, anhydride, and ester).

[469] Nonlimiting examples of the compound of Formula G include:


All-trans-retinoic acid

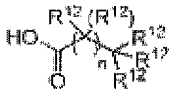

Retinol


Retinal


11-cis-retinoic acid

[470] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula G, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula G that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on **Y** and means of conjugation of **Y** to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** through any position of **Y**. In some embodiments, Formula G is conjugated to **L** or **Ab** at R^{11}.

[471] In some embodiments, **Y** acts at a peroxisome proliferator activated receptor (e.g. PPARα, PPARβ/δ, PPARγ). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the PPAR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of PPAR. In some embodiments, **Y** is a saturated or unsaturated, halogenated or nonhalogenated free fatty acid (FFA) as described by Formula H:



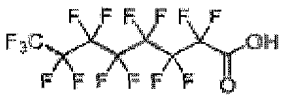
wherein n is 0-26 and each R^{12}, when present, is independently a moiety that permits or promotes agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula H to a PPAR.

[472] In some embodiments, **Y** comprises a structure of Formula H, wherein n is 0-26 and each R^{12}, when present, is independently hydrogen, C_1-C_7 alkyl, or halogen. In some embodiments Formula B is saturated such as, for example, formic acid, acetic acid, n-caproic

acid, heptanoic acid, caprylic acid, nonanoic acid, capric acid, undecanoic acid, lauric acid, tridecanoic acid, myristic acid, pentadeconoic acid, palmitic acid, heptadecanoic acid, stearic acid, nonadecanoic acid, arachidic acid, heneicosanoic acid, behenic acid, tricosanoic acid, perfluorononanoic acid (see below), perfluorooctanoic acid (see below), and derivatives thereof.



Perfluorononanoic acid

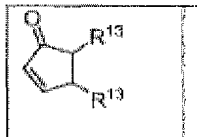
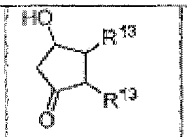
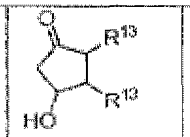
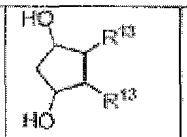


Perfluorooctanoic acid

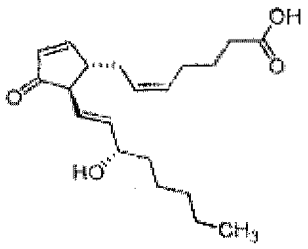
[473] In some embodiments Formula H is unsaturated with either cis or trans stereochemistry such as, for example, mead acid, myristoleic acid, palmitoleic acid, sapienic acid, oleic acid, linoleic acid, a-linolenic acid, elaidic acid, petroselinic acid, arachidonic acid, dihydroxyeicosatetraenoic acid (DiHETE), octadecynoic acid, eicosatriynoic acid, eicosadienoic acid, eicosatrienoic acid, eicosapentaenoic acid, erucic acid, dihomolinolenic acid, docosatrienoic acid, docosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, adrenic acid, and derivatives thereof.

[474] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula H, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula H that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula H and means of conjugation of Formula H to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula H is conjugated to **L** or **Ab** at any position on Formula H. In some embodiments, Formula H is conjugated to **L** or **Ab** through the terminal carboxylic acid moiety.

[475] In some of these embodiments, **Y** is an eiconsanoid. In specific embodiments, **Y** is a prostaglandin or a leukotriene. In some exemplary embodiments, **Y** is a prostaglandin having a structure as described by Formulae J1-J6:

					
Formula J1	Formula J2	Formula J3	Formula J4	Formula J5	Formula J6

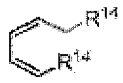
wherein each R 13 is independently a moiety that permits or promotes agonist or antagonist activity upon the binding of the compound of Formula J to a PPAR (e.g. PGJ2 as shown below):



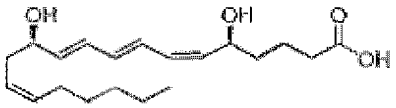
[476] In some embodiments when Y comprises a structure of any one of Formulae J1-J6, each R^{13} is independently C_7-C_8 alkyl, C_7-C_8 alkenyl, C_7-C_8 alkynyl, or heteroalkyl.

[477] In embodiments wherein **Y** is an eicosanoid, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **Ab** is a bond) at any position of the eicosanoid that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Y and means of conjugation of **Y** to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** through any position of **Y**. In some embodiments, the eicosanoid is conjugated to **L** or **Ab** through a terminal carboxylic acid moiety or through a pendant alcohol moiety.

[478] In some exemplary embodiments, Y is a leukotriene having a structure as described by Formula K or a derivatized form of Formula K:



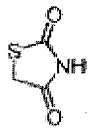
wherein each R is independently a moiety that permits or promotes agonist or antagonist activity upon the binding of the compound of Formula K to a PPAR (e.g. leukotriene B4 as shown below):



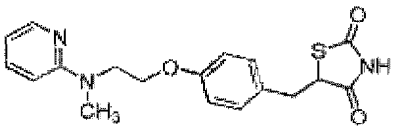
[479] In some embodiments when Y comprises a structure of Formula K, each R is independently C_3-C_{13} alkyl, C_3-C_{13} alkenyl, C3-C_{13} alkynyl, or heteroalkyl.

[480] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula K, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula K that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula K and means of conjugation of Formula K to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula K is conjugated to **L** or **Ab** at any position on Formula K. In some embodiments, Formula K is conjugated to **L** or **Ab** through the terminal carboxylic acid moiety or through a pendant alcohol moiety.

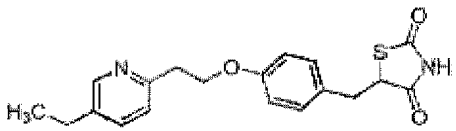
[481] In some exemplary embodiments, **Y** is a thiazolidinedione comprising a structure as described by Formula L:



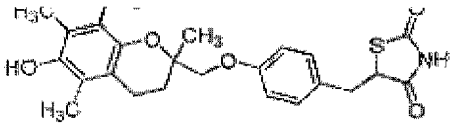
Nonlimiting examples of the compound of Formula L include:



Rosiglitazone



Pioglitazone



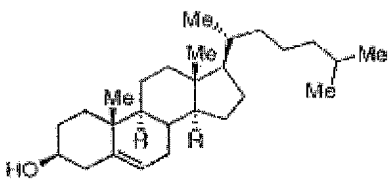
Troglitazone

and derivatives thereof.

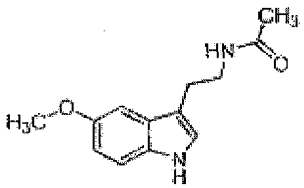
[482] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula L, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when L is a bond) at any position of Formula **L** that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula L and means of conjugation of Formula L to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula L is conjugated to **L** or **Ab** at any position on Formula L, such as, for example, a pendant alcohol moiety, or through an aromatic substituent.

[483] In some embodiments, **Y** acts at a RAR-related orphan receptor (e.g. RORα, RORβ, RORγ). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the ROR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of ROR.

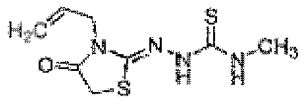
[484] Nonlimiting examples of Y include:



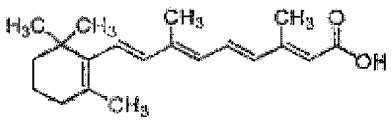
Cholesterol,



Melatonin,



CGP 52608,

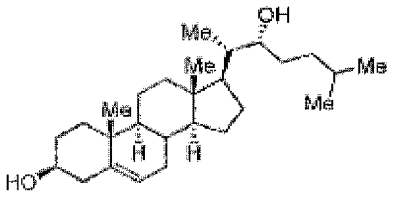


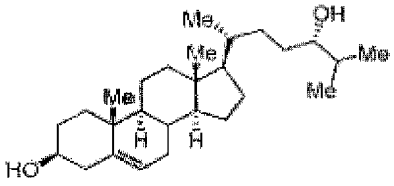
All-trans-retinoic acid,

and derivatives thereof.

[485] In embodiments wherein **Y** acts at a ROR, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of **Y** that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on **Y** and means of conjugation of **Y** to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** through any position of **Y**, such as, for example, any of the positions previously described herein.

[486] In some embodiments, **Y** acts at a liver X receptor (LXRa, LXR). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the LXR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of LXR. In exemplary embodiments, **Y** is an oxysterol (i.e. oxygenated derivative of cholesterol). Nonlimiting examples of **Y** in these embodiments include 22(R)-hydroxycholesterol (see below), 24(S)-hydroxycholesterol (see below), 27-hydroxycholesterol, cholestenoic acid, and derivatives thereof.

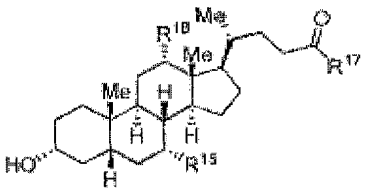




22(R)-Hydroxycholesterol 24(S)-Hydroxycholesterol

[487] In embodiments wherein **Y** acts at a LXR, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of **Y** that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on **Y** and means of conjugation of **Y** to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or 26 of Formula F. In some embodiments, Formula F is conjugated to **L** or **Ab** at position 3 or 17 of Formula F.

[488] In some embodiments, **Y** acts at the farnesoid X receptor (FXR). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the FXR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of FXR. In some of these embodiments, Y is a bile acid. In exemplary embodiments, **Y** has a structure of Formula M:

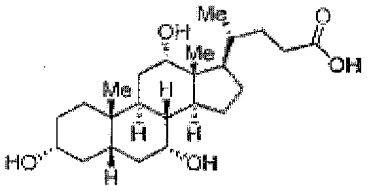


wherein each of R^{15}, R^{16}, and R^{17} are independently moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula M to a FXR.

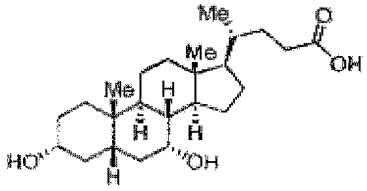
[489] In some embodiments when Y comprises a structure of Formula M, each of R^{15} and R^{16} are independently hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, C_2-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, or (C_0-C_8 alkyl)OH; and R^{17} is OH, (C_0-C_8 alkyl)NH(C_1-C_4 alkyl)SO_3H, or (C_0-C_8 alkyl)NH(C_1-C_4 alkyl)COOH.

[490] In some embodiments when **Y** comprises a structure of Formula M, each of R^{15} and R^{16} are independently hydrogen or OH; and R^{17} is OH, NH(C_1-C_2 alkyl)SO_3H, or NH(C_1-C_2 alkyl)COOH.

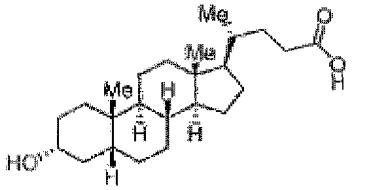
[491] Nonlimiting examples of the compound of Formula M include:



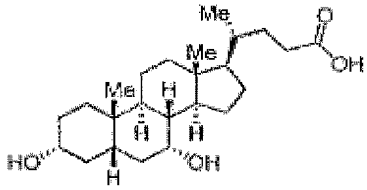
Cholic acid



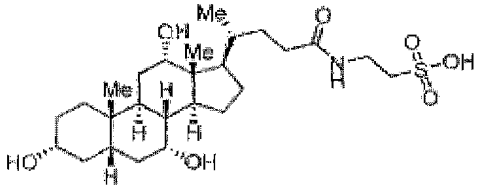
Deoxycholic acid



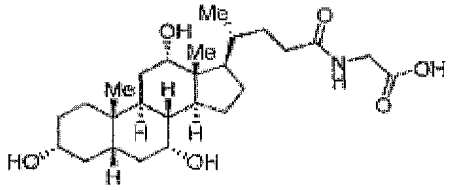
Lithocholic acid



Chenodeoxycholic acid



Taurocholic acid



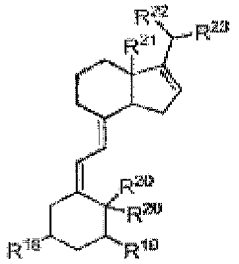
Glycocholic acid

and derivatives thereof.

[492] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula M, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula M that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the

position of conjugation on Formula M and means of conjugation of Formula M to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula M is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 of Formula M. In some embodiments, Formula M is conjugated to **L** or **Ab** at position 3, 7, 12 or 17 of Formula M.

[493] In some embodiments, **Y** acts at the vitamin D receptor (VDR). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the VDR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of VDR. In exemplary embodiments, **Y** has a structure of Formula N:



wherein each of R^{18} , R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} , and R^{23} are moieties that permit or promote agonist or antagonist activity upon binding of the compound of Formula N to the VDR such as, for example, any of the vitamin D compounds found in Bouillon et al., Endocrine Reviews, 16(2):200-257 (1995).

[494] In some embodiments wherein Y comprises a structure of Formula N,

R^{18} and R^{19} are each independently hydrogen, (C_0-C_8 alkyl)halo, (C_0-C_8 alkyl)heteroaryl, or (C_0-C_8 alkyl)OH;

both of R^{20} are hydrogen or both of R^{20} are taken together to form =CH2;

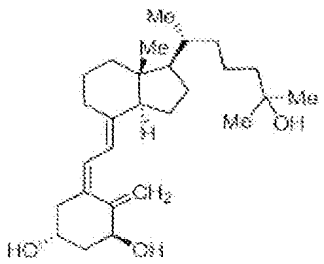
each of R^{21} and R^{22} are independently C_1-C4 alkyl; and

R^{23} is C_4-C_{18} alkyl, C_4-C_{18} alkenyl, C_4-C_{18} alkynyl, heteroalkyl, (C_4-C_{18} alkyl)aryl, (C_4-C_{18} alkyl)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkenyl)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkynyl)OC_1- C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_6-C_{18} alkyl)OH, (C_6-C_{18} alkyl)SH, (C_6-C_{18} alkenyl)OH, (C_6-C_{18} alkynyl)OH, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkenyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkynyl)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)H, (C_0-C_8 alkyl)C(O)aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)C(O)O aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(0)0 heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_1-Ci_8 alkyl, (C_0-C_8

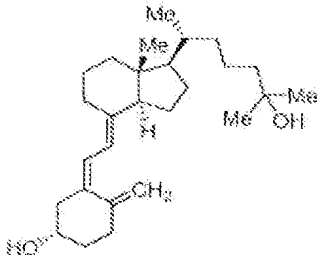
alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)C_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}aryl, (C_0-C_8 alkyl)C(O)NR^{24}heteroaryl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)C_2$-C_8 alkenyl, or (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(0)C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}C(O)OH$, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_1-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OC_2-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)OH, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}C_2$-C_{18} alkynyl, (C_0-C_8 alkyl)OC(O)$NR^{24}H_2$, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_1$-C_{18} alkyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_2$-C_{18} alkenyl, (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OC_2$-C_{18} alkynyl, or (C_0-C_8 alkyl)$NR^{24}(O)OH$; and

R^{24} is hydrogen or C_1-C_{18} alkyl.

[495] Nonlimiting examples of the compound of Formula N include:



Calcitriol,



25-Hydroxyvitamin D_3,

and derivatives thereof.

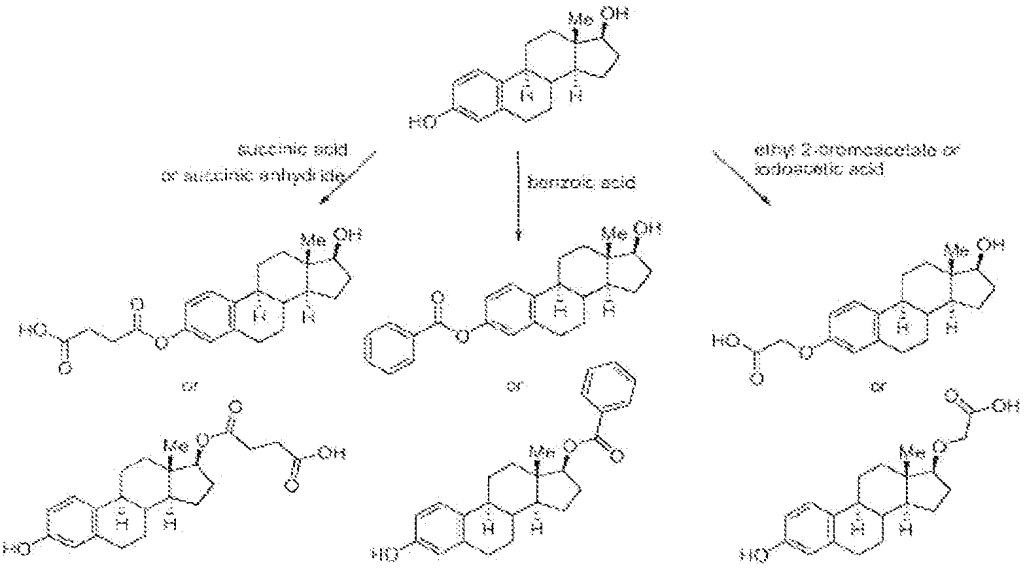
[496] In embodiments wherein **Y** comprises a structure of Formula N, **Y** is conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of Formula N that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on Formula N and means of conjugation of Formula N to Ab or L in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, Formula N is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, or 26 of Formula N. In some embodiments, Formula N is conjugated to **L** or **Ab** at position 1, 3, 19, or 25 of Formula N.

[497] In some embodiments, **Y** acts at the pregnane X receptor (PXR). In some embodiments, **Y** comprises any structure that permits or promotes agonist activity at the PXR, while in other embodiments **Y** is an antagonist of PXR. In some embodiments, **Y** is a steroid, antibiotic, antimycotic, bile acid, hyperforin, or a herbal compound. In exemplary embodiments, **Y** is compound that is able to induce CYP3A4, such as dexamethasone and rifampicin. In embodiments wherein **Y** comprises a structure that acts at the PXR, **Y** is

conjugated to **L** (e.g. when **L** is a linking group) or **Ab** (e.g. when **L** is a bond) at any position of **Y** that is capable of reacting with **Ab** or **L**. One skilled in the art could readily determine the position of conjugation on **Y** and means of conjugation of **Y** to **Ab** or **L** in view of general knowledge and the disclosure provided herein. In some embodiments, **Y** is conjugated to **L** or **Ab** at any of positions on **Y**.

[498] In some embodiments, the NRL is derivatized or otherwise chemically modified to comprise a reactive moiety that is capable of reacting with the glucagon superfamily peptide (**Ab**) or the linking group (**L**). In the embodiments described herein, **Y** is derivatized at any position of **Y** that is capable of reacting with **Ab** or **L**. The position of derivatization on **Y** is apparent to one skilled in the art and depends on the type of NRL used and the activity that is desired. For example, in embodiments wherein **Y** has a structure comprising a tetracyclic skeleton having three 6-membered rings joined to one 5-membered ring or a variation thereof, **Y** can be derivatized at any of positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25. Other positions of derivatization can be as previously described herein.

[499] The NRL can be derivatized using any agent known to one skilled in the art or described herein (e.g. see The Linking Group section and the Chemical Modification of **Ab** and/or **Y** subsection). For example, estradiol can be derivatized with succinic acid, succinic anhydride, benzoic acid, ethyl 2-bromoacetate, or iodoacetic acid to form the below derivatives of estradiol that are capable of conjugating to **Ab** or **L**.



[500] Similarly, any of the aforementioned NRL can be derivatized by methods known in the art. Additionally, certain derivatized ligands are commercially available and can be purchased from chemical companies such as Sigma-Aldrich.

Conjugates

[501] In some embodiments, the peptides and antibodies (**Ab**) described herein are glycosylated, amidated, carboxylated, phosphorylated, esterified, N-acylated, cyclized via, e.g., a disulfide bridge, or converted into a salt (e.g., an acid addition salt, a basic addition salt), and/or optionally dimerized, multimerized, or polymerized, or conjugated. As described herein, **Ab** can be a glucagon superfamily peptide, glucagon related peptide, including a Class 1, 2, 3, 4 or 5 glucagon related peptide, or osteocalcin, calcitonin, amylin, or an analog, derivative or conjugate thereof.

[502] The present disclosure also encompasses conjugates in which **Ab** of **Ab-L-Y** is further linked to a heterologous moiety. The conjugation between **Ab** and the heterologous moiety can be through covalent bonding, non-covalent bonding (e.g. electrostatic interactions, hydrogen bonds, van der Waals interactions, salt bridges, hydrophobic interactions, and the like), or both types of bonding. A variety of non-covalent coupling systems may be used, including biotin-avidin, ligand/receptor, enzyme/substrate, nucleic acid/nucleic acid binding protein, lipid/lipid binding protein, cellular adhesion molecule partners; or any binding partners or fragments thereof which have affinity for each other. In some aspects, the covalent bonds are peptide bonds. The conjugation of **Ab** to the heterologous moiety may be indirect or direct conjugation, the former of which may involve a linker or spacer. Suitable linkers and spacers are known in the art and include, but not limited to, any of the linkers or spacers described herein.

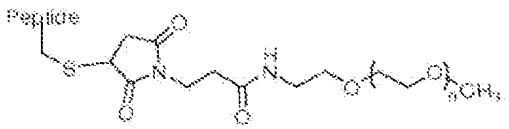
[503] As used herein, the term "heterologous moiety" is synonymous with the term "conjugate moiety" and refers to any molecule (chemical or biochemical, naturally-occurring or non-coded) which is different from **Ab** to which it is attached. Exemplary conjugate moieties that can be linked to **Ab** include but are not limited to a heterologous peptide or polypeptide (including for example, a plasma protein), a targeting agent, an immunoglobulin or portion thereof (e.g., variable region, CDR, or Fc region), a diagnostic label such as a radioisotope, fluorophore or enzymatic label, a polymer including water soluble polymers, or other therapeutic or diagnostic agents. In some embodiments a conjugate is provided comprising Ab and a plasma protein, wherein the plasma protein is selected from the group consisting of albumin, transferin, fibrinogen and globulins. In some embodiments the plasma

protein moiety of the conjugate is albumin or transferin. The conjugate in some embodiments comprises Ab and one or more of a polypeptide, a nucleic acid molecule, an antibody or fragment thereof, a polymer, a quantum dot, a small molecule, a diagnostic agent, a carbohydrate, an amino acid.

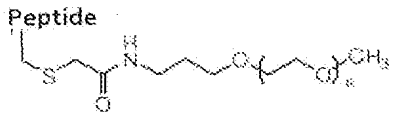
Hydrophilic Heterologous Moiety

[504] In some embodiments, **Ab** described herein is covalently bonded to a hydrophilic moiety. As described herein, **Ab** can be a glucagon superfamily peptide, glucagon related peptide, including a Class 1, 2, 3, 4 or 5 glucagon related peptide, or osteocalcin, calcitonin, amylin, or an analog, derivative or conjugate thereof. Hydrophilic moieties can be attached to **Ab** under any suitable conditions used to react a protein with an activated polymer molecule. Any means known in the art can be used, including via acylation, reductive alkylation, Michael addition, thiol alkylation or other chemoselective conjugation/ligation methods through a reactive group on the PEG moiety (e.g., an aldehyde, amino, ester, thiol, α-haloacetyl, maleimido or hydrazino group) to a reactive group on the target compound (e.g., an aldehyde, amino, ester, thiol, a-haloacetyl, maleimido or hydrazino group). Activating groups which can be used to link the water soluble polymer to one or more proteins include without limitation sulfone, maleimide, sulfhydryl, thiol, triflate, tresylate, azidirine, oxirane, 5-pyridyl, and alpha-halogenated acyl group (e.g., alpha-iodo acetic acid, alpha-bromoacetic acid, alpha-chloroacetic acid). If attached to the peptide by reductive alkylation, the polymer selected should have a single reactive aldehyde so that the degree of polymerization is controlled. See, for example, Kinstler et al., *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002); and Zalipsky et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995).

[505] Further activating groups which can be used to link the hydrophilic moiety (water soluble polymer) to a protein include an alpha-halogenated acyl group (e.g., alpha-iodo acetic acid, alpha-bromoacetic acid, alpha-chloroacetic acid). In specific aspects, an amino acid residue of the peptide having a thiol is modified with a hydrophilic moiety such as PEG. In some embodiments, an amino acid on **Ab** comprising a thiol is modified with maleimide-activated PEG in a Michael addition reaction to result in a PEGylated peptide comprising the thioether linkage shown below:



[506] In some embodiments, the thiol of an amino acid of **Ab** is modified with a haloacetyl-activated PEG in a nucleophilic substitution reaction to result in a PEGylated peptide comprising the thioether linkage shown below:



[507] Suitable hydrophilic moieties include polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, polyoxyethylated polyols (e.g., POG), polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated glycerol (POG), polyoxyalkylenes, polyethylene glycol propionaldehyde, copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, mono-(C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol, carboxymethylcellulose, polyacetals, polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, poly (.beta.-amino acids) (either homopolymers or random copolymers), poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propropylene glycol homopolymers (PPG) and other polyakylene oxides, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, colonic acids or other polysaccharide polymers, Ficoll or dextran and mixtures thereof. Dextrans are polysaccharide polymers of glucose subunits, predominantly linked by α1-6 linkages. Dextran is available in many molecular weight ranges, e.g., about 1 kD to about 100 kD, or from about 5, 10, 15 or 20 kD to about 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 or 90 kD.

[508] The hydrophilic moiety, e.g., polyethylene glycol chain, in accordance with some embodiments has a molecular weight selected from the range of about 500 to about 40,000 Daltons. In some embodiments the polyethylene glycol chain has a molecular weight selected from the range of about 500 to about 5,000 Daltons, or about 1,000 to about 5,000 Daltons. In another embodiment the hydrophilic moiety, e.g., polyethylene glycol chain, has a molecular weight of about 10,000 to about 20,000 Daltons. In yet other exemplary embodiments the hydrophilic moiety, e.g. polyethylene glycol chain, has a molecular weight of about 20,000 to about 40,000 Daltons.

[509] Linear or branched hydrophilic polymers are contemplated. Resulting preparations of conjugates may be essentially monodisperse or polydisperse, and may have about 0.5, 0.7, 1, 1.2, 1.5 or 2 polymer moieties per peptide.

[510] In some embodiments, the native amino acid of the peptide is substituted with an amino acid having a side chain suitable for crosslinking with hydrophilic moieties, to

facilitate linkage of the hydrophilic moiety to the peptide. Exemplary amino acids include Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or acetyl phenylalanine (Ac-Phe). In other embodiments, an amino acid modified to comprise a hydrophilic group is added to the peptide at the C-terminus.

[511] In some embodiments, the peptide of the conjugate is conjugated to a hydrophilic moiety, e.g. PEG, via covalent linkage between a side chain of an amino acid of the peptide and the hydrophilic moiety. In some embodiments, where Ab is a Class 1, 2, 3, 4 or 5 glucagon-related peptide, the peptide is conjugated to a hydrophilic moiety via the side chain of an amino acid at position 16, 17, 21, 24, 29, 40, a position within a C-terminal extension, or the C-terminal amino acid, or a combination of these positions. In some aspects, the amino acid covalently linked to a hydrophilic moiety (e.g., the amino acid comprising a hydrophilic moiety) is a Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the side chain of the amino acid is covalently bonded to a hydrophilic moiety (e.g., PEG).

The Linking Group (L)

[512] As described herein, the present disclosures provide glucagon superfamily peptides conjugated with NHR ligands having the formula **Ab-L-Y**, wherein **L** is a linking group or a chemical bond. In some embodiments, **L** is stable in vivo. In some embodiments, L is hydrolyzable in vivo. In some embodiments, **L** is metastable in vivo.

[513] **Ab** and **Y** can be linked together through **L** using standard linking agents and procedures known to those skilled in the art. In some aspects, **Ab** and **Y** are fused directly and **L** is a bond. In other aspects, **Ab** and **Y** are fused through a linking group **L**. For example, in some embodiments, **Ab** and **Y** are linked together via a peptide bond, optionally through a peptide or amino acid spacer. In some embodiments, **Ab** and **Y** are linked together through chemical conjugation, optionally through a linking group (**L**). In some embodiments, **L** is directly conjugated to each of **Ab** and **Y**.

[514] Chemical conjugation can occur by reacting a nucleophilic reactive group of one compound to an electrophilic reactive group of another compound. In some embodiments when **L** is a bond, **Ab** is conjugated to **Y** either by reacting a nucleophilic reactive moiety on **Ab** with an electrophilic reactive moiety on **Y**, or by reacting an electrophilic reactive moiety on **Ab** with a nucleophilic reactive moiety on **Y**. In embodiments when **L** is a group that links **Ab** and **Y** together, **Ab** and/or **Y** can be conjugated to **L** either by reacting a nucleophilic reactive moiety on **Ab** and/or **Y** with an electrophilic reactive moiety on **L**, or by

reacting an electrophilic reactive moiety on **Ab** and/or **Y** with a nucleophilic reactive moiety on **L**. Nonlimiting examples of nucleophilic reactive groups include amino, thiol, and hydroxyl. Nonlimiting examples of electrophilic reactive groups include carboxyl, acyl chloride, anhydride, ester, succinimide ester, alkyl halide, sulfonate ester, maleimido, haloacetyl, and isocyanate. In embodiments where **Ab** and **Y** are conjugated together by reacting a carboxylic acid with an amine, an activating agent can be used to form an activated ester of the carboxylic acid.

[515] The activated ester of the carboxylic acid can be, for example, N-hydroxysuccinimide (NHS), tosylate (Tos), mesylate, triflate, a carbodiimide, or a hexafluorophosphate. In some embodiments, the carbodiimide is 1 ,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 1 ,1'-carbonyldiimidazole (CDI), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), or 1,3-diisopropylcarbodiimide (DICD). In some embodiments, the hexafluorophosphate is selected from a group consisting of hexafluorophosphate benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP), benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1 ,1 ,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate (HATU), and o-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU).

[516] In some embodiments, **Ab** comprises a nucleophilic reactive group (e.g. the amino group, thiol group, or hydroxyl group of the side chain of lysine, cysteine or serine) that is capable of conjugating to an electrophilic reactive group on **Y** or **L**. In some embodiments, **Ab** comprises an electrophilic reactive group (e.g. the carboxylate group of the side chain of Asp or Glu) that is capable of conjugating to a nucleophilic reactive group on **Y** or **L**. In some embodiments, **Ab** is chemically modified to comprise a reactive group that is capable of conjugating directly to **Y** or to **L**. In some embodiments, **Ab** is modified at the C-terminal to comprise a natural or nonnatural amino acid with a nucleophilic side chain, such as an amino acid represented by Formula I, Formula II, or Formula III, as previously described herein. In exemplary embodiments, the C-terminal amino acid of **Ab** is selected from the group consisting of lysine, ornithine, serine, cysteine, and homocysteine. For example, the C-terminal amino acid of **Ab** can be modified to comprise a lysine residue. In some embodiments, **Ab** is modified at the C-terminal amino acid to comprise a natural or nonnatural amino acid with an electrophilic side chain such as, for example, Asp and Glu. In some embodiments, an internal amino acid of **Ab** is substituted with a natural or nonnatural amino acid having a nucleophilic side chain, such as an amino acid represented by Formula I,

Formula II, or Formula III, as previously described herein. In exemplary embodiments, the internal amino acid of **Ab** that is substituted is selected from the group consisting of lysine, ornithine, serine, cysteine, and homocysteine. For example, an internal amino acid of **Ab** can be substituted with a lysine residue. In some embodiments, an internal amino acid of **Ab** is substituted with a natural or nonnatural amino acid with an electrophilic side chain, such as, for example, Asp and Glu.

[517] In some embodiments, **Y** comprises a reactive group that is capable of conjugating directly to **Ab** or to **L**. In some embodiments, **Y** comprises a nucleophilic reactive group (e.g. amine, thiol, hydroxyl) that is capable of conjugating to an electrophilic reactive group on **Ab** or **L**. In some embodiments, **Y** comprises electrophilic reactive group (e.g. carboxyl group, activated form of a carboxyl group, compound with a leaving group) that is capable of conjugating to a nucleophilic reactive group on **Ab** or **L**. In some embodiments, **Y** is chemically modified to comprise either a nucleophilic reactive group that is capable of conjugating to an electrophilic reactive group on **Ab** or **L**. In some embodiments, **Y** is chemically modified to comprise an electrophilic reactive group that is capable of conjugating to a nucleophilic reactive group on **Ab** or **L**.

[518] In some embodiments, conjugation can be carried out through organosilanes, e,g, aminosilane treated with glutaraldehyde; carbonyldiimidazole (CDI) activation of silanol groups; or utilization of dendrimers. A variety of dendrimers are known in the art and include poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers, which are synthesized by the divergent method starting from ammonia or ethylenediamine initiator core reagents; a sub-class of PAMAM dendrimers based on a tris-aminoethylene-imine core; radially layered poly(amidoamine-organosilicon) dendrimers (PAMAMOS), which are inverted unimolecular micelles that consist of hydrophilic, nucleophilic polyamidoamine (PAMAM) interiors and hydrophobic organosilicon (OS) exteriors; Poly (Propylene Imine) (PPI) dendrimers, which are generally poly-alkyl amines having primary amines as end groups, while the dendrimer interior consists of numerous of tertiary tris-propylene amines; Poly (Propylene Amine) (POPAM) dendrimers; Diaminobutane (DAB) dendrimers; amphiphilic dendrimers; micellar dendrimers which are unimolecular micelles of water soluble hyper branched polyphenylenes; polylysine dendrimers; and dendrimers based on poly-benzyl ether hyper branched skeleton.

[519] In some embodiments, conjugation can be carried out through olefin metathesis. In some embodiments, **Y** and **Ab**, **Y** and **L**, or **Ab** and **L** both comprise an alkene or alkyne moiety that is capable of undergoing metathesis. In some embodiments a suitable catalyst

(e.g. copper, ruthenium) is used to accelerate the metathesis reaction. Suitable methods of performing olefin metathesis reactions are described in the art. See, for example, Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000), Walensky et al., *Science* 305: 1466-1470 (2004), and Blackwell et al., Angew, *Chem., Int. Ed.* 37: 3281-3284 (1998).

[520] In some embodiments, conjugation can be carried out using click chemistry. A "click reaction" is wide in scope and easy to perform, uses only readily available reagents, and is insensitive to oxygen and water. In some embodiments, the click reaction is a cycloaddition reaction between an alkynyl group and an azido group to form a triazolyl group. In some embodiments, the click reaction uses a copper or ruthenium catalyst. Suitable methods of performing click reactions are described in the art. See, for example, Kolb et al., *Drug Discovery Today* 8: 1128 (2003); Kolb et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:2004 (2001); Rostovtsev et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 :2596 (2002); Tornoe et al., *J. Org. Chem.* 67:3057 (2002); Manetsch et al., *J. Am. Chem. Soc.* 126: 12809 (2004); Lewis et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 1053 (2002); Speers, *J. Am. Chem. Soc.* 125:4686 (2003); Chan et al. Org. Lett. 6:2853 (2004); Zhang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127: 15998 (2005); and Waser et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127:8294 (2005).

[521] Indirect conjugation via high affinity specific binding partners, e.g. streptavidin/biotin or avidin/biotin or lec tin/carbohydrate is also contemplated.

*Chemical Modification of **Ab** and/or **Y***

[522] In some embodiments, **Ab** and/or **Y** are functionalized to comprise a nucleophilic reactive group or an electrophilic reactive group with an organic derivatizing agent. This derivatizing agent is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of targeted amino acids on **Ab** and functional groups on **Y**. Reactive groups on **Ab** and/or **Y** include, e.g., aldehyde, amino, ester, thiol, a-haloacetyl, maleimido or hydrazino group. Derivatizing agents include, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride or other agents known in the art. Alternatively, **Ab** and/or **Y** can be linked to each other indirectly through intermediate carriers, such as polysaccharide or polypeptide carriers. Examples of polysaccharide carriers include aminodextran. Examples of suitable polypeptide carriers include polylysine, polyglutamic acid, polyaspartic acid, co-polymers thereof, and mixed polymers of these amino acids and others, e.g., serines, to confer desirable solubility properties on the resultant loaded carrier.

[523] Cysteinyl residues most commonly are reacted with a-haloacetates (and corresponding amines), such as chloroacetic acid or chloroacetamide, to give carboxymethyl or carboxyamidomethyl derivatives. Cysteinyl residues also are derivatized by reaction with bromotrifluoroacetone, alpha-bromo-β-(5-imidozoyl)propionic acid, chloroacetyl phosphate, N-alkylmaleimides, 3-nitro-2-pyridyl disulfide, methyl 2-pyridyl disulfide, p-chloromercuribenzoate, 2-chloromercuri-4-nitrophenol, or chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-l,3-diazole.

[524] Histidyl residues are derivatized by reaction with diethylpyrocarbonate at pH 5.5-7.0 because this agent is relatively specific for the histidyl side chain. Para-bromophenacyl bromide also is useful; the reaction is preferably performed in 0.1 M sodium cacodylate at pH 6.0.

[525] Lysinyl and amino-terminal residues are reacted with succinic or other carboxylic acid anhydrides. Derivatization with these agents has the effect of reversing the charge of the lysinyl residues. Other suitable reagents for derivatizing alpha-amino-containing residues include imidoesters such as methyl picolinimidate, pyridoxal phosphate, pyridoxal, chloroborohydride, trinitrobenzenesulfonic acid, O-methylisourea, 2,4-pentanedione, and transaminase-catalyzed reaction with glyoxylate.

[526] Arginyl residues are modified by reaction with one or several conventional reagents, among them phenylglyoxal, 2,3-butanedione, 1 ,2-cyclohexanedione, and ninhydrin. Derivatization of arginine residues requires that the reaction be performed in alkaline conditions because of the high pKa of the guanidine functional group. Furthermore, these reagents may react with the groups of lysine as well as the arginine epsilon-amino group.

[527] The specific modification of tyrosyl residues may be made, with particular interest in introducing spectral labels into tyrosyl residues by reaction with aromatic diazonium compounds or tetranitromethane. Most commonly, N-acetylimidizole and tetranitromethane are used to form O-acetyl tyrosyl species and 3-nitro derivatives, respectively.

[528] Carboxyl side groups (aspartyl or glutamyl) are selectively modified by reaction with carbodiimides (R-N=C=N-R'), where R and R' are different alkyl groups, such as 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide or 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl) carbodiimide. Furthermore, aspartyl and glutamyl residues are converted to asparaginyl and glutaminyl residues by reaction with ammonium ions.

[529] Other modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the alpha-amino groups of

lysine, arginine, and histidine side chains (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), deamidation of asparagine or glutamine, acetylation of the N-terminal amine, and/or amidation or esterification of the C-terminal carboxylic acid group.

[530] Another type of covalent modification involves chemically or enzymatically coupling glycosides to the peptide. Sugar(s) may be attached to (a) arginine and histidine, (b) free carboxyl groups, (c) free sulfhydryl groups such as those of cysteine, (d) free hydroxyl groups such as those of serine, threonine, or hydroxyproline, (e) aromatic residues such as those of tyrosine, or tryptophan, or (f) the amide group of glutamine. These methods are described in WO87/05330 published 11 Sep. 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

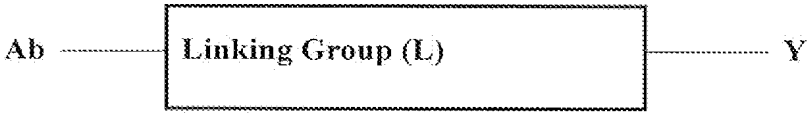
Structure of ***L***

[531] In some embodiments, **L** is a bond. In these embodiments, **Ab** and **Y** are conjugated together by reacting a nucleophilic reactive moiety on **Ab** with and electrophilic reactive moiety on **Y**. In alternative embodiments, **Ab** and **Y** are conjugated together by reacting an electrophilic reactive moiety on **Ab** with a nucleophilic moiety on **Y**. In exemplary embodiments, **L** is an amide bond that forms upon reaction of an amine on **Ab** (e.g. an ε-amine of a lysine residue) with a carboxyl group on **Y**. In alternative embodiments, **Ab** and or **Y** are derivatized with a derivatizing agent before conjugation.

[532] In some embodiments, **L** is a linking group. In some embodiments, **L** is a bifunctional linker and comprises only two reactive groups before conjugation to **Ab** and **Y**. In embodiments where both **Ab** and **Y** have electrophilic reactive groups, **L** comprises two of the same or two different nucleophilic groups (e.g. amine, hydroxyl, thiol) before conjugation to **Ab** and **Y**. In embodiments where both **Ab** and **Y** have nucleophilic reactive groups, **L** comprises two of the same or two different electrophihc groups (e.g. carboxyl group, activated form of a carboxyl group, compound with a leaving group) before conjugation to **Ab** and **Y**. In embodiments where one of **Ab** or **Y** has a nucleophilic reactive group and the other of **Ab** or **Y** has an electrophihc reactive group, **L** comprises one nucleophilic reactive group and one electrophihc group before conjugation to **Ab** and **Y**.

[533] L can be any molecule with at least two reactive groups (before conjugation to Ab and Y) capable of reacting with each of Ab and Y. In some embodiments L has only two reactive

groups and is bifunctional. L (before conjugation to the peptides) can be represented by Formula VI:



wherein A and B are independently nucleophilic or electrophilic reactive groups. In some embodiments A and B are either both nucleophilic groups or both electrophilic groups. In some embodiments one of A or B is a nucleophilic group and the other of A or B is an electrophilic group. Nonlimiting combinations of A and B are shown below.

Both Nucleophilic		**Both Electrophilic**		**Nucleophilic/Electrophilic**	
A	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**
Amino	Amino	Carboxyl	Carboxyl	Amino	Carboxyl
Amino	Thiol	Carboxyl	Acyl chloride	Amino	Acyl chloride
Amino	Hydroxyl	Carboxyl	Anhydride	Amino	Anhydride
Thiol	Amino	Carboxyl	Ester	Amino	Ester
Thiol	Thiol	Carboxyl	NHS	Amino	NHS
Thiol	Hydroxyl	Carboxyl	Halogen	Amino	Halogen
Hydroxyl	Amino	Carboxyl	Sulfonate ester	Amino	Sulfonate ester
Hydroxyl	Thiol	Carboxyl	Maleimido	Amino	Maleimido
Hydroxyl	Hydroxyl	Carboxyl	Haloacetyl	Amino	Haloacetyl
		Carboxyl	Isocyanate	Amino	Isocyanate
		Acyl chloride	Carboxyl	Thiol	Carboxyl
		Acyl chloride	Acyl chloride	Thiol	Acyl chloride
		Acyl chloride	Anhydride	Thiol	Anhydride
		Acyl chloride	Ester	Thiol	Ester
		Acyl chloride	NHS	Thiol	NHS
		Acyl chloride	Halogen	Thiol	Halogen
		Acyl chloride	Sulfonate ester	Thiol	Sulfonate ester
		Acyl chloride	Maleimido	Thiol	Maleimido
		Acyl chloride	Haloacetyl	Thiol	Haloacetyl
		Acyl chloride	Isocyanate	Thiol	Isocyanate

Both Nucleophilic		Both Electrophilic		Nucleophilic/Electrophilic	
		Anhydride	Carboxyl	Hydroxyl	Carboxyl
		Anhydride	Acyl chloride	Hydroxyl	Acyl chloride
		Anhydride	Anhydride	Hydroxyl	Anhydride
		Anhydride	Ester	Hydroxyl	Ester
		Anhydride	NHS	Hydroxyl	NHS
		Anhydride	Halogen	Hydroxyl	Halogen
		Anhydride	Sulfonate ester	Hydroxyl	Sulfonate ester
		Anhydride	Maleimido	Hydroxyl	Maleimido
		Anhydride	Haloacetyl	Hydroxyl	Haloacetyl
		Anhydride	Isocyanate	Hydroxyl	Isocyanate
		Ester	Carboxyl		
		Ester	Acyl chloride		
		Ester	Anhydride		
		Ester	Ester		
		Ester	NHS		
		Ester	Halogen		
		Ester	Sulfonate ester		
		Ester	Maleimido		
		Ester	Haloacetyl		
		Ester	Isocyanate		
		NHS	Carboxyl		
		NHS	Acyl chloride		
		NHS	Anhydride		
		NHS	Ester		
		NHS	NHS		
		NHS	Halogen		
		NHS	Sulfonate ester		
		NHS	Maleimido		
		NHS	Haloacetyl		
		NHS	Isocyanate		
		Halogen	Carboxyl		

Both Nucleophilic		Both Electrophilic		Nucleophilic/Electrophilic	
		Halogen	Acyl chloride		
		Halogen	Anhydride		
		Halogen	Ester		
		Halogen	NHS		
		Halogen	Halogen		
		Halogen	Sulfonate ester		
		Halogen	Maleimido		
		Halogen	Haloacetyl		
		Halogen	Isocyanate		
		Sulfonate ester	Carboxyl		
		Sulfonate ester	Acyl chloride		
		Sulfonate ester	Anhydride		
		Sulfonate ester	Ester		
		Sulfonate ester	NHS		
		Sulfonate ester	Halogen		
		Sulfonate ester	Sulfonate ester		
		Sulfonate ester	Maleimido		
		Sulfonate ester	Haloacetyl		
		Sulfonate ester	Isocyanate		
		Maleimido	Carboxyl		
		Maleimido	Acyl chloride		
		Maleimido	Anhydride		
		Maleimido	Ester		
		Maleimido	NHS		
		Maleimido	Halogen		
		Maleimido	Sulfonate ester		
		Maleimido	Maleimido		
		Maleimido	Haloacetyl		
		Maleimido	Isocyanate		
		Haloacetyl	Carboxyl		
		Haloacetyl	Acyl chloride		

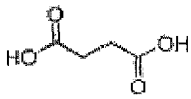
Both Nucleophilic		Both Electrophilic		Nucleophilic/Electrophilic	
		Haloacetyl	Anhydride		
		Haloacetyl	Ester		
		Haloacetyl	NHS		
		Haloacetyl	Halogen		
		Haloacetyl	Sulfonate ester		
		Haloacetyl	Maleimido		
		Haloacetyl	Haloacetyl		
		Haloacetyl	Isocyanate		
		Isocyanate	Carboxyl		
		Isocyanate	Acyl chloride		
		Isocyanate	Anhydride		
		Isocyanate	Ester		
		Isocyanate	NHS		
		Isocyanate	Halogen		
		Isocyanate	Sulfonate ester		
		Isocyanate	Maleimido		
		Isocyanate	Haloacetyl		
		Isocyanate	Isocyanate		

In some embodiments, **A** and **B** may include alkene and/or alkyne functional groups that are suitable for olefin metathesis reactions. In some embodiments, **A** and **B** include moieties that are suitable for click chemistry (e.g. alkene, alkynes, nitriles, azides). Other nonlimiting examples of reactive groups (**A** and **B**) include pyridyldithiol, aryl azide, diazirine, carbodiimide, and hydrazide.

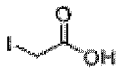
[534] In some embodiments, **L** is hydrophobic. Hydrophobic linkers are known in the art. See, e.g., *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), which is incorporated by reference in its entirety. Suitable hydrophobic linking groups known in the art include, for example, 8 -hydroxy octanoic acid and 8-mercaptooctanoic acid. Before conjugation to the peptides of the composition, the hydrophobic linking group comprises at least two reactive groups (**A** and **B**), as described herein and as shown below:



[535] In some embodiments, the hydrophobic linking group comprises either a maleimido or an iodoacetyl group and either a carboxylic acid or an activated carboxylic acid (e.g. NHS ester) as the reactive groups. In these embodiments, the maleimido or iodoacetyl group can be coupled to a thiol moiety on **Ab** or **Y** and the carboxylic acid or activated carboxylic acid can be coupled to an amine on **Ab** or **Y** with or without the use of a coupling reagent. Any coupling agent known to one skilled in the art can be used to couple the carboxylic acid with the free amine such as, for example, DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU, and other activating agents described herein. In specific embodiments, the hydrophilic linking group comprises an aliphatic chain of 2 to 100 methylene groups wherein A and B are carboxyl groups or derivatives thereof (e.g. succinic acid). In other specific embodiments the **L** is iodoacetic acid.



succinic acid



iodoacetic acid

[536] In some embodiments, the linking group is hydrophilic such as, for example, polyalkylene glycol. Before conjugation to the peptides of the composition, the hydrophilic linking group comprises at least two reactive groups (A and B), as described herein and as shown below:



In specific embodiments, the linking group is polyethylene glycol (PEG). The PEG in certain embodiments has a molecular weight of about 100 Daltons to about 10,000 Daltons, e.g. about 500 Daltons to about 5000 Daltons. The PEG in some embodiments has a molecular weight of about 10,000 Daltons to about 40,000 Daltons.

[537] In some embodiments, the hydrophilic linking group comprises either a maleimido or an iodoacetyl group and either a carboxylic acid or an activated carboxylic acid (e.g. NHS ester) as the reactive groups. In these embodiments, the maleimido or iodoacetyl group can be coupled to a thiol moiety on **Ab** or **Y** and the carboxylic acid or activated carboxylic acid can be coupled to an amine on **Ab** or **Y** with or without the use of a coupling reagent. Any

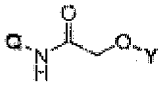
appropriate coupling agent known to one skilled in the art can be used to couple the carboxylic acid with the amine such as, for example, DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU, and other activating agents described herein In some embodiments, the linking group is maleimido-PEG(20 kDa)-COOH, iodoacetyl-PEG(20 kDa)-COOH, maleimido-PEG(20 kDa)-NHS, or iodoacetyl-PEG(20 kDa)-NHS.

[538] In some embodiments, the linking group is comprised of an amino acid, a dipeptide, a tripeptide, or a polypeptide, wherein the amino acid, dipeptide, tripeptide, or polypeptide comprises at least two activating groups, as described herein. In some embodiments, the linking group (**L**) comprises a moiety selected from the group consisting of: amino, ether, thioether, maleimido, disulfide, amide, ester, thioester, alkene, cycloalkene, alkyne, trizoyl, carbamate, carbonate, cathepsin B-cleavable, and hydrazone.

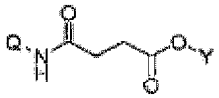
[539] In some embodiments, L comprises a chain of atoms from 1 to about 60, or 1 to 30 atoms or longer, 2 to 5 atoms, 2 to 10 atoms, 5 to 10 atoms, or 10 to 20 atoms long. In some embodiments, the chain atoms are all carbon atoms. In some embodiments, the chain atoms in the backbone of the linker are selected from the group consisting of C, O, N, and S. Chain atoms and linkers may be selected according to their expected solubility (hydrophilicity) so as to provide a more soluble conjugate. In some embodiments, **L** provides a functional group that is subject to cleavage by an enzyme or other catalyst or hydrolytic conditions found in the target tissue or organ or cell. In some embodiments, the length of **L** is long enough to reduce the potential for steric hindrance.

*Stability of **L** in vivo*

[540] In some embodiments, **L** is stable in vivo. In some embodiments, **L** is stable in blood serum for at least 5 minutes, e.g. less than 25%, 20%, 15%, 10% or 5% of the conjugate is cleaved when incubated in serum for a period of 5 minutes. In other embodiments, **L** is stable in blood serum for at least 10, or 20, or 25, or 30, or 60, or 90, or 120 minutes, or 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 or 24 hours. In these embodiments, **L** does not comprise a functional group that is capable of undergoing hydrolysis in vivo. In some exemplary embodiments, **L** is stable in blood serum for at least about 72 hours. Nonlimiting examples of functional groups that are not capable of undergoing significant hydrolysis *in vivo* include amides, ethers, and thioethers. For example, the following compound is not capable of undergoing significant hydrolysis *in vivo*:



[541] In some embodiments, **L** is hydrolyzable in vivo. In these embodiments, **L** comprises a functional group that is capable of undergoing hydrolysis in vivo. Nonlimiting examples of functional groups that are capable of undergoing hydrolysis in vivo include esters, anhydrides, and thioesters. For example the following compound is capable of undergoing hydrolysis in vivo because it comprises an ester group:



[542] In some exemplary embodiments **L** is labile and undergoes substantial hydrolysis within 3 hours in blood plasma at 37 °C, with complete hydrolysis within 6 hours. In some exemplary embodiments, **L** is not labile.

[543] In some embodiments, **L** is metastable in vivo. In these embodiments, **L** comprises a functional group that is capable of being chemically or enzymatically cleaved in vivo (e.g., an acid-labile, reduction-labile, or enzyme-labile functional group), optionally over a period of time. In these embodiments, **L** can comprise, for example, a hydrazone moiety, a disulfide moiety, or a cathepsin-cleavable moiety. When **L** is metastable, and without intending to be bound by any particular theory, the **Ab-L-Y** conjugate is stable in an extracellular environment, e.g., stable in blood serum for the time periods described above, but labile in the intracellular environment or conditions that mimic the intracellular environment, so that it cleaves upon entry into a cell. In some embodiments when **L** is metastable, **L** is stable in blood serum for at least about 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 42, or 48 hours, for example, at least about 48, 54, 60, 66, or 72 hours, or about 24-48, 48-72, 24-60, 36-48, 36-72, or 48-72 hours.

[544] In some embodiments, **L** is metastable in vivo. In these embodiments, **L** comprises a functional group that is capable of being chemically or enzymatically cleaved in vivo (e.g., an acid-labile, reduction-labile, or enzyme-labile functional group), optionally over a period of time. In these embodiments, **L** can comprise, for example, a hydrazone moiety, a disulfide moiety, or a cathepsin-cleavable moiety. When **L** is metastable, and without intending to be bound by any particular theory, the **Ab-L-Y** conjugate is stable in an extracellular environment, e.g., stable in blood serum for the time periods described above, but labile in the intracellular environment or conditions that mimic the intracellular environment, so that it cleaves upon entry into a cell. In some embodiments when L is metastable, L is stable in

blood serum for at least about 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 42, or 48 hours, for example, at least about 48, 54, 60, 66, or 72 hours, or about 24-48, 48-72, 24-60, 36-48, 36-72, or 48-72 hours.

Ab-L-Y Conjugates

*Conjugation of **Ab** and **Y***

Conjugation of **Ab** to **Y** through **L** can be carried out an any position within **Ab**, including any of positions 1-29, a position within a C-terminal extension, or the C-terminal amino acid, provided that the activity of **Ab** is retained, if not enhanced. In some embodiments, Y is conjugated to Ab through L at one or more of positions 10, 20, 24, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 32, or 43. In specific embodiments, Y is conjugated to Ab through L at position 10 and/or 40 of Ab.

Activity

Activity at the Antibody-binding Receptor and the Nuclear Receptor

[545] In some embodiments, **Ab-L-Y** exhibits activity at both the Ab-binding receptor and a nuclear receptor. In some embodiments, the activity (e.g., the EC_{50} or the relative activity or potency) of **Ab** at the Ab-binding receptor is within about 100-fold, about 75-fold, about 60-fold, about 50-fold, about 40-fold, about 30-fold, about 20-fold, about 10-fold, or about 5 fold different (higher or lower) from the activity (e.g., the EC_{50} or the relative activity or potency) of **Y** at a nuclear hormone receptor. In some embodiments, the Ab-binding potency of **Ab** is within about 25-, about 20-, about 15-, about 10-, or about 5-fold different (higher or lower) from the potency of **Y**.

[546] In some embodiments, the ratio of the relative activity or the EC_{50} or the potency of the **Ab** at the Ab-binding receptor divided by the relative activity or the EC_{50} or potency of **Y** at a nuclear hormone receptor is less than, or is about, X, wherein X is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, or 5. In some embodiments, the ratio of the EC_{50} or potency or relative activity of **Ab** at the Ab-binding receptor divided by the EC_{50} or potency or relative activity of Y at a nuclear hormone receptor is about 1 less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In some embodiments, the ratio of the Ab-binding potency of **Ab** compared to the nuclear hormone potency of **Y** is less than, or is about, Z, wherein Z is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, and 5. In some embodiments, the ratio of the Ab-binding potency of **Ab** compared to the nuclear potency **Y** is less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In some embodiments, **Ab** has an EC_{50} at the Ab-binding receptor which is 2- to

10-fold (e.g., 2-fold, 3-fold, 4-fold, 5-fold, 6-fold, 7-fold, 8-fold, 9-fold, 10-fold) greater than the EC_{50} of **Y** at a nuclear receptor.

[547] In some embodiments, the ratio of the relative activity or potency or the EC_{50} of **Y** at a nuclear hormone receptor divided by the relative activity or potency or the EC_{50} of **Ab** at the Ab-binding receptor is less than, or is about, V, wherein V is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, or 5. In some embodiments, the ratio of the EC_{50} or potency or relative activity of **Y** at a nuclear receptor divided by the EC_{50} or potency or relative activity of **Ab** at the Ab-binding receptor is less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In some embodiments, the ratio of the nuclear potency of **Y** compared to the Ab-binding potency of **Ab** is less than, or is about, W, wherein W is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, and 5. In some embodiments, the ratio of the nuclear potency of **Y** compared to the Ab-binding potency of **Ab** is less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In some embodiments, **Y** has an EC_{50} at a nuclear receptor which is about 2- to about 10-fold (e.g., 2-fold, 3-fold, 4-fold, 5-fold, 6-fold, 7-fold, 8-fold, 9-fold, 10-fold) greater than the EC_{50} of **Ab** at the Ab-binding receptor.

[548] In some embodiments, **Y** exhibits at least 0.1% (e.g., about 0.5% or more, about 1% or more, about 5% or more, about 10% or more, or more) of the activity of endogenous ligand at a nuclear receptor (nuclear potency) and **Ab** exhibits at least 0.1% (e.g., about 0.5% or more, about 1% or more, about 5% or more, about 10% or more, or more) of the activity of native antibody at the antibody-binding receptor (antibody potency).

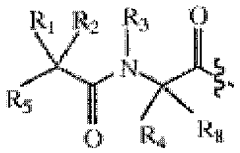
*Prodrugs of **Ab-L-Y***

[549] In some aspects of the invention, prodrugs of **Ab-L-Y** are provided wherein the prodrug comprises a dipeptide prodrug element (A-B) covalently linked to an active site of **Ab** via an amide linkage, as disclosed in International Patent Application No. PCT US09/68745 (filed on December 18, 2009), which is incorporated herein by reference in its entirety. Subsequent removal of the dipeptide under physiological conditions and in the absence of enzymatic activity, restores full activity to the **Ab-L-Y** conjugate.

[550] In some embodiments a prodrug of **Ab-L-Y** is provided having the general structure of A-B-**Ab-L-Y**. In these embodiments A is an amino acid or a hydroxy acid and B is an N-alkylated amino acid linked to **Ab** through formation of an amide bond between a carboxyl of B (in A-B) and an amine of **Ab**. Furthermore, in some embodiments, A, B, or the amino acid of **Ab** to which A-B is linked, is a non-coded amino acid, and chemical cleavage of A-B from **Ab** is at least about 90% complete within about 1 to about 720 hours in PBS under

physiological conditions. In another embodiment, chemical cleavage of A-B from **Ab** is at least about 50% complete within about 1 hour or about 1 week in PBS under physiological conditions.

[551] In some embodiment the dipeptide prodrug element (A-B) comprises a compound having the general structure below:



wherein

R_1, R_2, R_4 and R_8 are independently selected from the group consisting of H, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, (C_1-C_{18} alkyl)OH, (C_1-C_{18} alkyl)SH, (C_2-C_3 alkyl)SCH_3, (C_1-C_4 alkyl)$CONH_2$, (C_1-C_4 alkyl)COOH, (C_1-C_4 alkyl)NH_2, (Ci-C_4 alkyl)$NHC(NH_2^+)NH_2$, (C_0-C_4 alkyl)(C_3-C_6 cycloalkyl), (C_0-C_4 alkyl)(C_2-C_5 heterocyclic), (C_0-C_4 alkyl)(C_6-C_{10} aryl)R_7, (C_1-C_4 alkyl)(C_3-C_9 heteroaryl), and C_1-C_{12} alkyl(W_1)C_1-C_{12} alkyl, wherein W_1 is a heteroatom selected from the group consisting of N, S and O, or R_1 and R_2 together with the atoms to which they are attached form a C_3-C_{12} cycloalkyl; or R_4 and R_8 together with the atoms to which they are attached form a C_3-C_6 cycloalkyl;

R_3 is selected from the group consisting of C_1-C_{18} alkyl, (C_1-C_{18} alkyl)OH, (C_1-C_{18} alkyl)NH_2, (C_1-C_{18} alkyl)SH, (C_0-C_4 alkyl)(C_3-C_6)cycloalkyl, (C_0-C_4 alkyl)(C_2-C_5 heterocyclic), (C_0-C4 alkyl)(C_6-C_{10} aryl)R_7, and (C_1-C_4 alkyl)(C_3-C_9 heteroaryl) or R_4 and R_3 together with the atoms to which they are attached form a 4, 5 or 6 member heterocyclic ring;

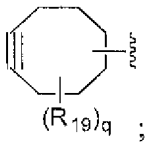
R_5 is NHR_6 or OH;

R_6 is H, C_1-C_8 alkyl or R_6 and R_1 together with the atoms to which they are attached form a 4, 5 or 6 member heterocyclic ring; and

R_7 is selected from the group consisting of hydrogen, C_1-C_{18} alkyl, C_2-C_{18} alkenyl, (C_0-C_4 alkyl)$CONH_2$, (C_0-C_4 alkyl)COOH, (C_0-C_4 alkyl)NH_2, (C_0-C_4 alkyl)OH, and halo.

[552] In some embodiments, the dipeptide prodrug element is linked to the amino terminus of **Ab**. In other embodiments, the dipeptide prodrug is linked to an internal amino acid of **Ab**, as described in International Patent Application No. PCT US09/68745.

[553] In some embodiments, Y is azide. In other embodiments, Y is cycloalkyne. In specific embodiments, the cyclooctyne has a structure of:



;

each R_{19} is independently selected from the group consisting of C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, ester, ether, thioether, aminoalkyl, halogen, alkyl ester, aryl ester, amide, aryl amide, alkyl halide, alkyl amine, alkyl sulfonic acid, alkyl nitro, thioester, sulfonyl ester, halosulfonyl, nitrile, alkyl nitrile, and nitro; and

q is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11.

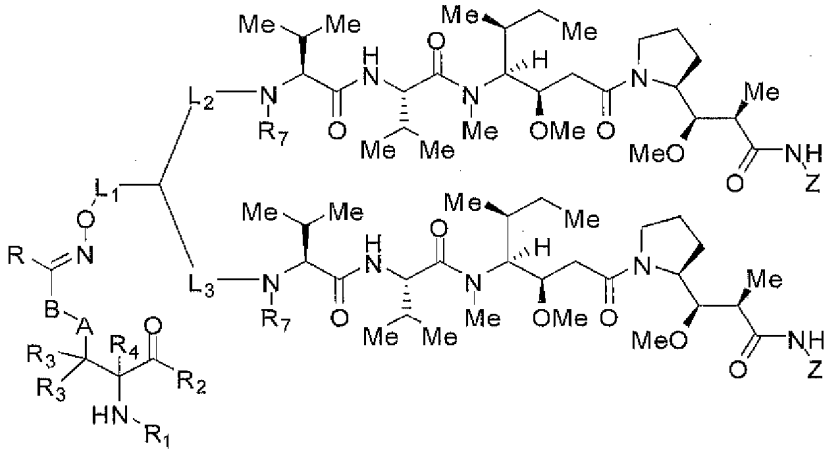
[554] In certain embodiments of compounds of Formula (IV) and (VI), V is a hydroxylamine, methyl, aldehyde, protected aldehyde, ketone, protected ketone, thioester, ester, dicarbonyl, hydrazine, amidine, imine, diamine, keto-amine, keto-alkyne, and ene-dione.

[555] In certain embodiments of compounds of Formula (I), (III), (IV), (V), and (VI), each L, L_1, L_2, L_3, and L_4 is independently a cleavable linker or non-cleavable linker. In certain embodiments of compounds of Formula (I), (III), (IV), (V), and (VI), each L, L_1, L_2, L_3, and L_4 is independently a oligo(ethylene glycol) derivatized linker.

[556] In certain embodiments of compounds of Formula (I), (III), (IV), (V), and (VI), each alkylene, alkylene', alkylene", and alkylene"' independently is $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, or $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$. In certain embodiments of compounds of Formula (XIV), (XV), (XVI), (XVII), and (XVIII), each n, n', n", n"', and n"" is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, or 100.

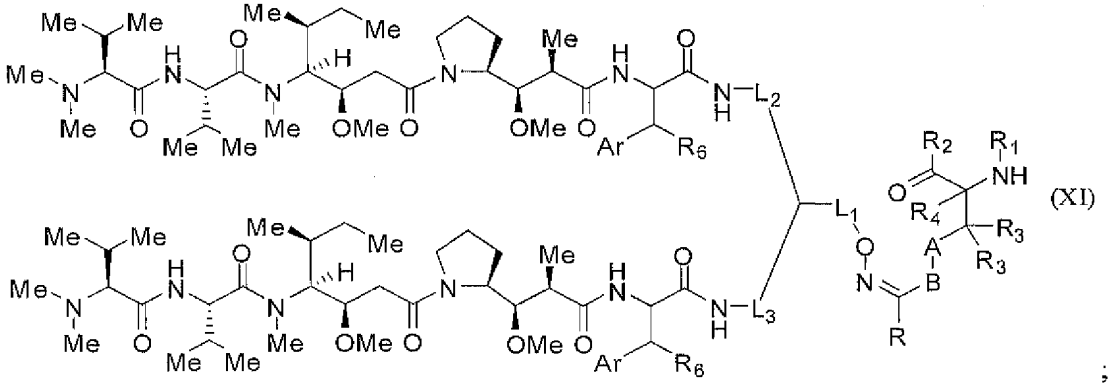
[557] In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), R_1 is a polypeptide. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), R_2 is a polypeptide. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), the polypeptide is an antibody. In certain embodiments of compounds of Formula (VIII) or (IX), the antibody is herceptin.

[558] Such non-natural amino acid NRL linked derivatives include NRL linked derivatives having the structure of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII):



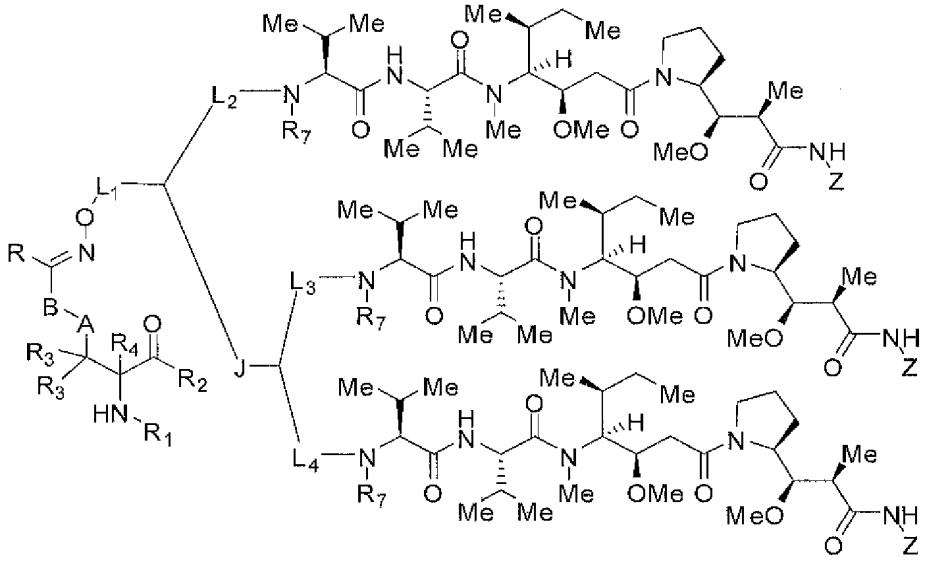
(X)

;



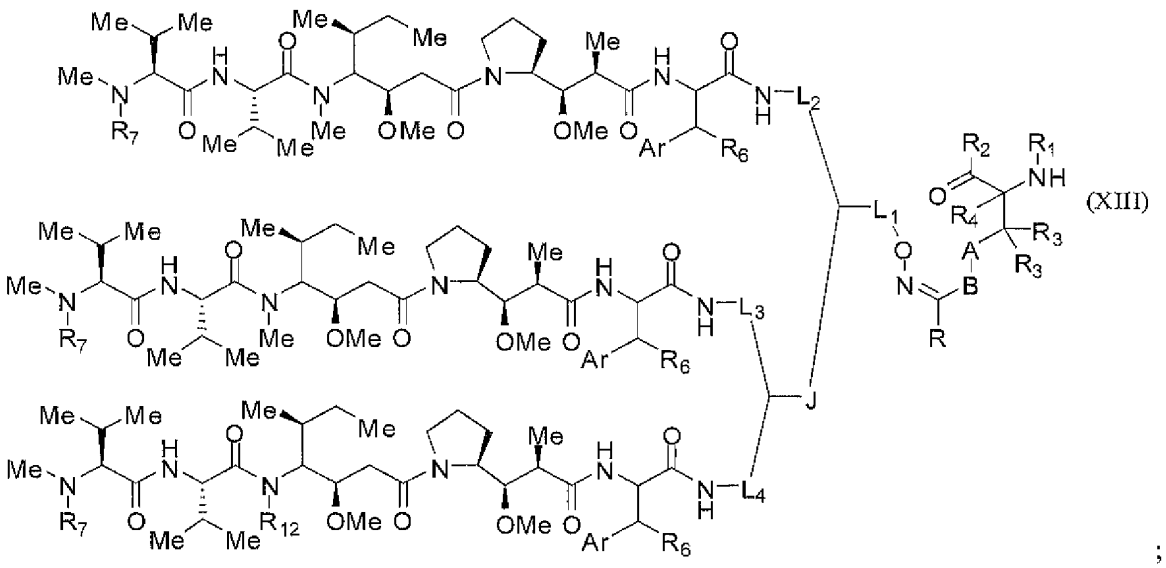
(XI)

;



(XII)

;



(XIII)

;

wherein:

A is optional, and when present is lower alkylene, substituted lower alkylene, lower cycloalkylene, substituted lower cycloalkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, alkynylene, lower heteroalkylene, substituted heteroalkylene, lower heterocycloalkylene, substituted lower heterocycloalkylene, arylene, substituted arylene, heteroarylene, substituted heteroarylene, alkarylene, substituted alkarylene, aralkylene, or substituted aralkylene;

B is optional, and when present is a linker selected from the group consisting of lower alkylene, substituted lower alkylene, lower alkenylene, substituted lower alkenylene, lower heteroalkylene, substituted lower heteroalkylene, -O-, -O-(alkylene or substituted alkylene)-, -S-, -S-(alkylene or substituted alkylene)-, -$S(O)_k$- where k is 1, 2, or 3, -$S(O)_k$(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')-, -NR'-(alkylene or substituted alkylene)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')CO-(alkylene or substituted alkylene)-, -N(R')C(O)O-, -$S(O)_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')$S(O)_k$N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -$C(R')_2$-N=N-, and -$C(R')_2$-N(R')-N(R')-, where each R' is independently H, alkyl, or substituted alkyl;

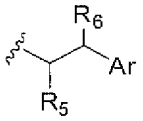
R is H, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_3 and R_4 are each independently H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl, or R_3 and R_4 or two R_3 groups optionally form a cycloalkyl or a heterocycloalkyl;

Z has the structure of:



;

R_5 is H, CO_2H, C_1-C_6alkyl, or thiazole;

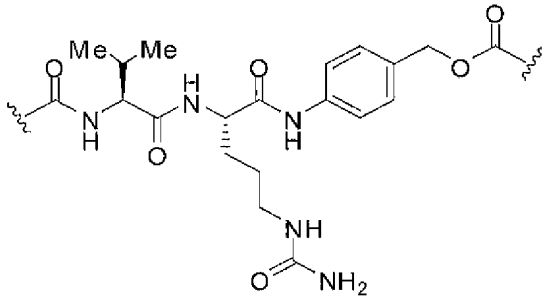
R_6 is OH or H;

Ar is phenyl or pyridine;

R_7 is C_1-C_6alkyl or hydrogen;

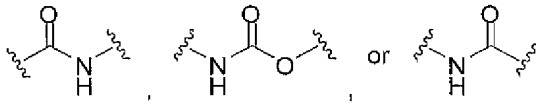
L_1, L_2, L_3, and L_4 are each linkers independently selected from the group consisting of a bond, –alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–J–, –alkylene'–J–(alkylene–O)$_n$–alkylene–, –J–(alkylene–O)$_n$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–J–(alkylene–O)$_n$'–alkylene–J'–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–J–alkylene'–, –W–, –alkylene–W–, alkylene'–J–(alkylene–NMe)$_n$–alkylene–W–, –J–(alkylene–NMe)$_n$–alkylene–W–, –J–alkylene–NMe–alkylene'–NMe–alkylene''–W–, and –alkylene–J–alkylene'–NMe–alkylene''–NMe–alkylene'''–W–;

W has the structure of:



;

each J and J' independently have the structure of:



; and

each n and n' are independently integers greater than or equal to one.

[559] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_5 is thiazole or carboxylic acid. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_6 is H. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), Ar is phenyl. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_7 is methyl. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), n and n' are integers from 0 to 20. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), n and n' are integers from 0 to 10. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), n and n' are integers from 0 to 5.

[560] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_5 is thiazole. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_5 is hydrogen. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_5 is methyl, ethyl, propyl, iso-propyl, butyl, iso-butyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, or hexyl. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_5 is $-NH-(alkylene-O)_n-NH_2$, wherein alkylene is $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, or $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$. In certain embodiments of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), alkylene is methylene, ethylene, propylene, butylenes, pentylene, hexylene, or heptylene.

[561] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_5 is $-NH-(alkylene-O)_n-NH_2$, wherein n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, or 100.

[562] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_6 is H. In some embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_6 is hydroxy.

[563] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), Ar is phenyl.

[564] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_7 is methyl, ethyl, propyl, iso-propyl, butyl, sec-butyl iso-butyl, tert-butyl, pentyl, or hexyl. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_7 is hydrogen.

[565] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), each L_1, L_2, L_3, and L_4 is independently a cleavable linker or non-cleavable linker. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), each L_1, L_2, L_3, and L_4 is independently a oligo(ethylene glycol) derivatized linker.

[566] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), each alkylene, alkylene', alkylene'', and alkylene''' independently is $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$, or $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), alkylene is methylene, ethylene, propylene, butylenes, pentylene, hexylene, or heptylene.

[567] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), each n and n' independently is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, or 100.

[568] In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_1 is a polypeptide. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), R_2 is a polypeptide. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), the polypeptide is an antibody. In certain embodiments of compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII), the antibody is herceptin.

[569] In certain embodiments, compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII) are stable in aqueous solution for at least 1 month under mildly acidic conditions. In certain embodiments, compounds of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII) are stable for at least 2 weeks under mildly acidic conditions. In certain embodiments, compound of Formula (X), (XI), (XII) or (XIII) are stable for at least 5 days under mildly acidic conditions. In certain embodiments, such acidic conditions are pH 2 to 8. Such non-natural amino acids may be in

the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally post translationally modified.

[570] Oxime-based non-natural amino acids may be synthesized by methods already described in the art, or by methods described herein, including: (a) reaction of a hydroxylamine-containing non-natural amino acid with a carbonyl- or dicarbonyl-containing reagent; (b) reaction of a carbonyl- or dicarbonyl-containing non-natural amino acid with a hydroxylamine-containing reagent; or (c) reaction of an oxime-containing non-natural amino acid with certain carbonyl- or dicarbonyl-containing reagents.

Chemical Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acid Linked Nuclear Receptor Ligand Derivatives: Alkylated Aromatic Amine Linked Nuclearl Receptor Ligand Derivatives

[571] In one aspect are NRL linker derivatives for the chemical derivatization of non-natural amino acids based upon the reactivity of an aromatic amine group. In further or additional embodiments, at least one of the aforementioned non-natural amino acids is incorporated into a NRL linker derivative, that is, such embodiments are non-natural amino acid linked NRL derivatives. In further or additional embodiments, the NRL linker derivatives are functionalized on their sidechains such that their reaction with a derivatizing non-natural amino acid generates an amine linkage. In further or additional embodiments, the NRL linker derivatives are selected from NRL linker derivatives having aromatic amine sidechains. In further or additional embodiments, the NRL linker derivatives comprise a masked sidechain, including a masked aromatic amine group. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids are selected from amino acids having aromatic amine sidechains. In further or additional embodiments, the non-natural amino acids comprise a masked sidechain, including a masked aromatic amine group.

[572] In another aspect are carbonyl-substituted NRL linker derivatives such as, by way of example, aldehydes, and ketones, for the production of derivatized non-natural amino acid polypeptides based upon an amine linkage. In a further embodiment are aldehyde-substituted NRL linker derivatives used to derivatize aromatic amine-containing non-natural amino acid polypeptides via the formation of an amine linkage between the derivatizing NRL linker and the aromatic amine-containing non-natural amino acid polypeptide.

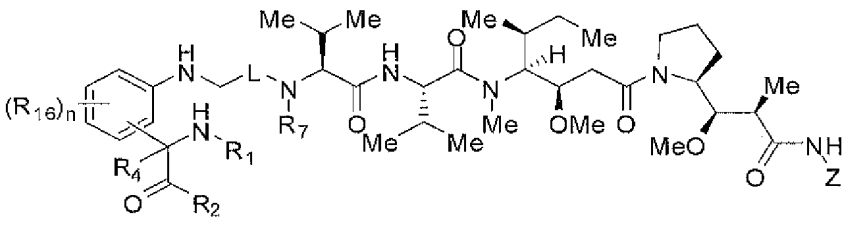
[573] In further or additional embodiments, the non-natural amino acids comprise aromatic amine sidechains where the aromatic amine is selected from an aryl amine or a heteroaryl amine. In a further or additional embodiment, the non-natural amino acids resemble a natural amino acid in structure but contain aromatic amine groups. In another or

further embodiment the non-natural amino acids resemble phenylalanine or tyrosine (aromatic amino acids). In one embodiment, the non-natural amino acids have properties that are distinct from those of the natural amino acids. In one embodiment, such distinct properties are the chemical reactivity of the sidechain; in a further embodiment this distinct chemical reactivity permits the sidechain of the non-natural amino acid to undergo a reaction while being a unit of a polypeptide even though the sidechains of the naturally-occurring amino acid units in the same polypeptide do not undergo the aforementioned reaction. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid has a chemistry orthogonal to those of the naturally-occurring amino acids. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid comprises a nucleophile-containing moiety; in a further embodiment, the nucleophile-containing moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo a reaction to generate an amine-linked derivatized NRL. In a further embodiment, the sidechain of the non-natural amino acid comprises an electrophile-containing moiety; in a further embodiment, the electrophile-containing moiety on the sidechain of the non-natural amino acid can undergo nucleophilic attack to generate an amine-linked derivatized NRL. In any of the aforementioned embodiments in this paragraph, the non-natural amino acid may exist as a separate molecule or may be incorporated into a polypeptide of any length; if the latter, then the polypeptide may further incorporate naturally-occurring or non-natural amino acids.

[574] Modification of non-natural amino acids described herein using reductive alkylation or reductive amination reactions have any or all of the following advantages. First, aromatic amines can be reductively alkylated with carbonyl-containing compounds, including aldehydes, and ketones, in a pH range of about 4 to about 10 (and in certain embodiments in a pH range of about 4 to about 7) to generate substituted amine, including secondary and tertiary amine, linkages. Second, under these reaction conditions the chemistry is selective for non-natural amino acids as the sidechains of naturally occurring amino acids are unreactive. This allows for site-specific derivatization of polypeptides which have incorporated non-natural amino acids containing aromatic amine moieties or protected aldehyde moieties, including, by way of example, recombinant proteins. Such derivatized polypeptides and proteins can thereby be prepared as defined homogeneous products. Third, the mild conditions needed to effect the reaction of an aromatic amine moiety on an amino acid, which has been incorporated into a polypeptide, with an aldehyde-containing reagent generally do not irreversibly destroy the tertiary structure of the polypeptide (excepting, of course, where

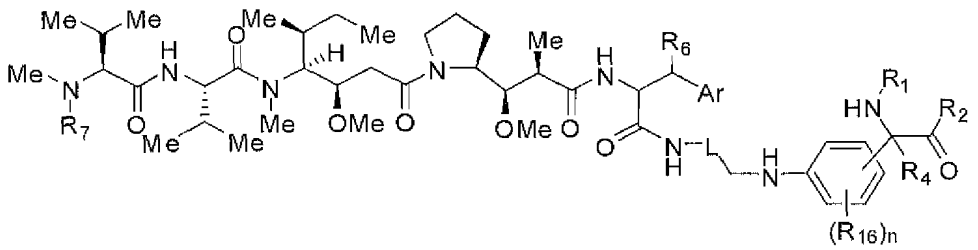
the purpose of the reaction is to destroy such tertiary structure). Similarly, the mild conditions needed to effect the reaction of an aldehyde moiety on an amino acid, which has been incorporated into a polypeptide and deprotected, with an aromatic amine-containing reagent generally do not irreversibly destroy the tertiary structure of the polypeptide (excepting, of course, where the purpose of the reaction is to destroy such tertiary structure). Fourth, the reaction occurs rapidly at room temperature, which allows the use of many types of polypeptides or reagents that would otherwise be unstable at higher temperatures. Fifth, the reaction occurs readily is aqueous conditions, again allowing use of polypeptides and reagents incompatible (to any extent) with non-aqueous solutions. Six, the reaction occurs readily even when the ratio of polypeptide or amino acid to reagent is stoichiometric, stoichiometric-like, or near-stoichiometric, so that it is unnecessary to add excess reagent or polypeptide to obtain a useful amount of reaction product. Seventh, the resulting amine can be produced regioselectively and/or regiospecifically, depending upon the design of the amine and carbonyl portions of the reactants. Finally, the reductive alkylation of aromatic amines with aldehyde-containing reagents, and the reductive amination of aldehydes with aromatic amine containing reagents, generates amine, including secondary and tertiary amine, linkages which are stable under biological conditions.

[575] Non-natural amino acids with nucleophilic reactive groups, such as, by way of example only, an aromatic amine group (including secondary and tertiary amine groups), a masked aromatic amine group (which can be readily converted into a aromatic amine group), or a protected aromatic amine group (which has reactivity similar to a aromatic amine group upon deprotection) allow for a variety of reactions to link molecules via various reactions, including but not limited to, reductive alkylation reactions with aldehyde containing NRL linked derivatives. Such alkylated non-natural amino acid linked NRL derivatives include amino acids having the structure of Formula (XXV), (XXVI), (XXVII), (XXVIII), (XXIX), or (XXX):

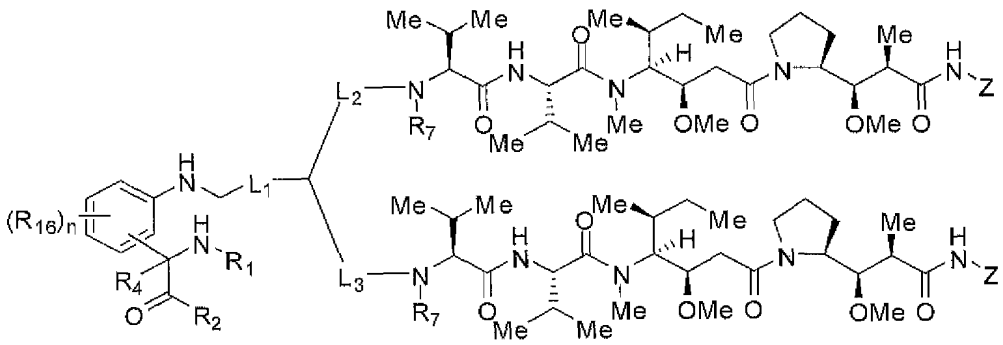


(XXV)

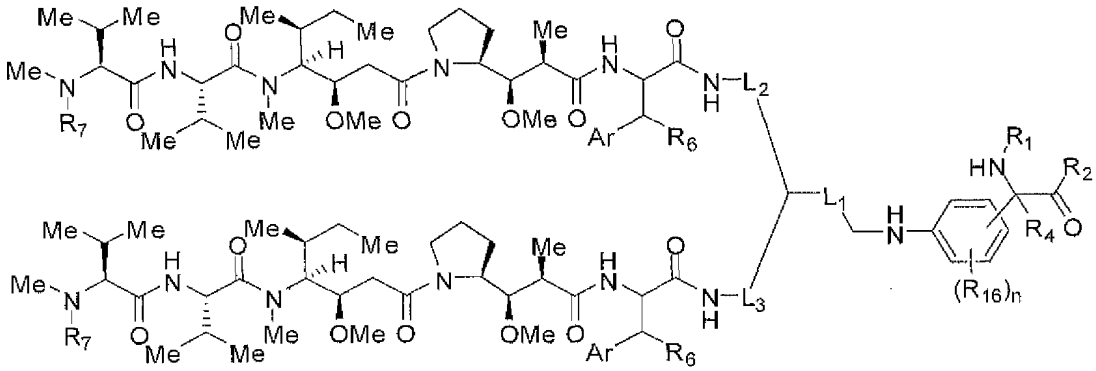
;



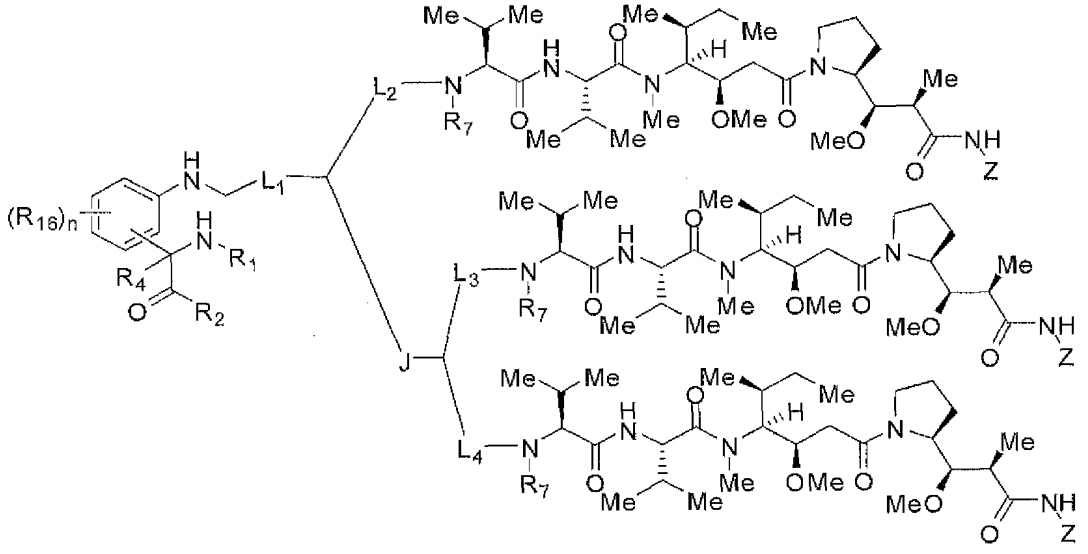
(XXVI)



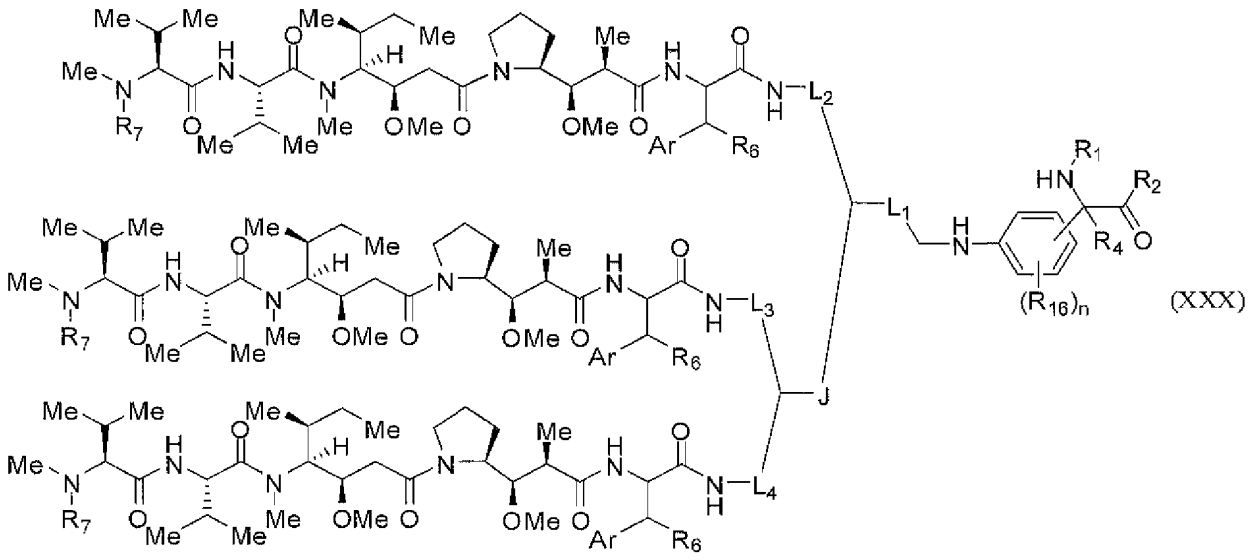
(XXVII)



(XXVIII)



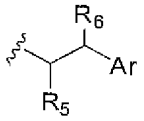
(XXIX)



(XXX)

wherein:

Z has the structure of:



;

R_5 is H, CO_2H, C_1-C_6alkyl, or thiazole;

R_6 is OH or H;

Ar is phenyl or pyridine;

R_1 is H, an amino protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

R_2 is OH, an ester protecting group, resin, at least one amino acid, polypeptide, or polynucleotide;

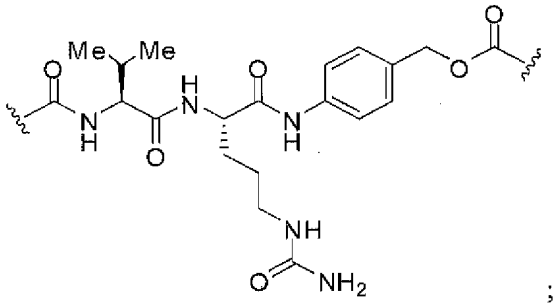
R_4 is H, halogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl;

R_7 is C_1-C_6alkyl or hydrogen;

L, L_1, L_2, L_3, and L_4 are each linkers selected from the group consisting of a bond, –alkylene–, –alkylene–C(O)–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–C(O)–, –(alkylene–O)$_n$–(CH$_2$)$_{n'}$–NHC(O)–(CH$_2$)$_{n'}$–C(Me)$_2$–S–S–(CH$_2$)$_{n''}$–NHC(O)–(alkylene–O)$_{n'''}$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–W–, –alkylene–C(O)–W–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–J–, –alkylene'–J–(alkylene–O)$_n$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–J–alkylene', –J–(alkylene–O)$_n$–alkylene–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–J–(alkylene–O)$_{n'}$–alkylene–J'–, –W–, –alkylene–W–, alkylene'–J– (alkylene–NMe)$_n$–alkylene–W–, and J–(alkylene–NMe)$_n$–alkylene–W–, –(alkylene–O)$_n$–alkylene–U–alkylene–C(O)–, –

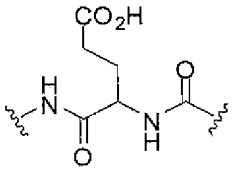
(alkylene–O)$_n$–alkylene–U–alkylene–; –J–alkylene–NMe–alkylene'–NMe–alkylene"–W–, and –alkylene–J–alkylene'–NMe–alkylene"–NMe–alkylene"'–W–;

W has the structure of:

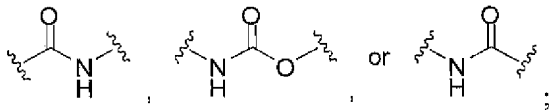


;

U has the structure of:



each J and J' independently have the structure of:



;

each n and n' are independently integers greater than or equal to one; and

each R_{16} is independently selected from the group consisting of hydrogen, halogen, alkyl, NO_2, CN, and substituted alkyl.

Such alkylated non-natural amino acid linked NRL derivatives may also be in the form of a salt, or may be incorporated into a non-natural amino acid polypeptide, polymer, polysaccharide, or a polynucleotide and optionally reductively alkylated.

Pharmaceutical Compositions

Salts

[576] In some embodiments, the **Ab-L-Y** conjugates described herein are in the form of a salt, e.g., a pharmaceutically acceptable salt. As used herein the term "pharmaceutically acceptable salt" refers to salts of compounds that retain the biological activity of the parent compound, and which are not biologically or otherwise undesirable. Such salts can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the conjugate, or separately prepared by reacting a free base function with a suitable acid. Many of the compounds disclosed herein are capable of forming acid and/or base salts by virtue of the presence of amino and/or carboxyl groups or groups similar thereto.

[577] Pharmaceutically acceptable acid addition salts may be prepared from inorganic and organic acids. Representative acid addition salts include, but are not limited to acetate, adipate, alginate, citrate, aspartate, benzoate, benzenesulfonate, bisulfate, butyrate, camphorate, camphor sulfonate, digluconate, glycerophosphate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, fumarate, hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, 2-hydroxyethansulfonate (isothionate), lactate, maleate, methane sulfonate, nicotinate, 2-naphthalene sulfonate, oxalate, palmitoate, pectinate, persulfate, 3-phenylpropionate, picrate, pivalate, propionate, succinate, tartrate, thiocyanate, phosphate, glutamate, bicarbonate, p-toluenesulfonate, and undecanoate. Salts derived from inorganic acids include hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like. Salts derived from organic acids include acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, p-toluene-sulfonic acid, salicylic acid, and the like. Examples of acids which can be employed to form pharmaceutically acceptable acid addition salts include, for example, an inorganic acid, e.g., hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulphuric acid, and phosphoric acid, and an organic acid, e.g., oxalic acid, maleic acid, succinic acid, and citric acid.

[578] Basic addition salts also can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the source of salicylic acid, or by reacting a carboxylic acid-containing moiety with a suitable base such as the hydroxide, carbonate, or bicarbonate of a pharmaceutically acceptable metal cation or with ammonia or an organic primary, secondary, or tertiary amine. Pharmaceutically acceptable salts include, but are not limited to, cations based on alkali metals or alkaline earth metals such as lithium, sodium, potassium, calcium, magnesium, and aluminum salts, and the like, and nontoxic quaternary ammonia and amine cations including ammonium, tetramethylammonium, tetraethylammonium, methylammonium, dimethylammonium, trimethylammonium, triethylammonium, diethylammonium, and ethylammonium, amongst others. Other representative organic amines useful for the formation of base addition salts include, for example, ethylenediamine, ethanolamine, diethanolamine, piperidine, piperazine, and the like. Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary, secondary and tertiary amines.

[579] Further, basic nitrogen-containing groups can be quaternized with the conjugate of the present disclosure as lower alkyl halides such as methyl, ethyl, propyl, and butyl chlorides, bromides, and iodides; long chain halides such as decyl, lauryl, myristyl, and stearyl

chlorides, bromides, and iodides; arylalkyl halides like benzyl and phenethyl bromides and others. Water or oil-soluble or dispersible products are thereby obtained.

Formulations

[580] In accordance with some embodiments, a pharmaceutical composition is provided wherein the composition comprises a **Ab-L-Y** conjugate of the present disclosure, orpharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical composition can comprise any pharmaceutically acceptable ingredient, including, for example, acidifying agents, additives, adsorbents, aerosol propellants, air displacement agents, alkalizing agents, anticaking agents, anticoagulants, antimicrobial preservatives, antioxidants, antiseptics, bases, binders, buffering agents, chelating agents, coating agents, coloring agents, desiccants, detergents, diluents, disinfectants, disintegrants, dispersing agents, dissolution enhancing agents, dyes, emollients, emulsifying agents, emulsion stabilizers, fillers, film forming agents, flavor enhancers, flavoring agents, flow enhancers, gelling agents, granulating agents, humectants, lubricants, mucoadhesives, ointment bases, ointments, oleaginous vehicles, organic bases, pastille bases, pigments, plasticizers, polishing agents, preservatives, sequestering agents, skin penetrants, solubilizing agents, solvents, stabilizing agents, suppository bases, surface active agents, surfactants, suspending agents, sweetening agents, therapeutic agents, thickening agents, tonicity agents, viscosity-increasing agents, water-absorbing agents, water-miscible cosolvents, water softeners, or wetting agents.

[581] In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises any one or a combination of the following components: acacia, acesulfame potassium, acetyl tributyl citrate, acetyltriethyl citrate, agar, albumin, alcohol, dehydrated alcohol, denatured alcohol, dilute alcohol, aleuritic acid, alginic acid, aliphatic polyesters, alumina, aluminum hydroxide, aluminum stearate, amylopectin, α-amylose, ascorbic acid, ascorbyl palmitate, aspartame, bacteriostatic water for injection, bentonite, bentonite magma, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, benzoic acid, benzyl alcohol, benzyl benzoate, bronopol, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, butylparaben, butylparaben sodium, calcium alginate, calcium ascorbate, calcium carbonate, calcium cyclamate, dibasic anhydrous calcium phosphate, dibasic dehydrate calcium phosphate, tribasic calcium phosphate, calcium propionate, calcium silicate, calcium sorbate, calcium stearate, calcium sulfate, calcium sulfate hemihydrate, canola oil, carbomer, carbon dioxide, carboxymethyl cellulose calcium, carboxymethyl cellulose sodium, β-carotene, carrageenan, castor oil, hydrogenated castor oil,

cationic emulsifying wax, cellulose acetate, cellulose acetate phthalate, ethyl cellulose, microcrystalline cellulose, powdered cellulose, silicified microcrystalline cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, cetostearyl alcohol, cetrimide, cetyl alcohol, chlorhexidine, chlorobutanol, chlorocresol, cholesterol, chlorhexidine acetate, chlorhexidine gluconate, chlorhexidine hydrochloride, chlorodifluoroethane (HCFC), chlorodifluoromethane, chlorofluorocarbons(CFC)chlorophenoxyethanol, chloroxylenol, corn syrup solids, anhydrous citric acid, citric acid monohydrate, cocoa butter, coloring agents, corn oil, cottonseed oil, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmellose sodium, crospovidone, cyclamic acid, cyclodextrins, dextrates, dextrin, dextrose, dextrose anhydrous, diazolidinyl urea, dibutyl phthalate, dibutyl sebacate, diethanolamine, diethyl phthalate, difluoroethane (HFC), dimethyl- β-cyclodextrin, cyclodextrin-type compounds such as Captisol®, dimethyl ether, dimethyl phthalate, dipotassium edentate, disodium edentate, disodium hydrogen phosphate, docusate calcium, docusate potassium, docusate sodium, dodecyl gallate, dodecyltrimethylammonium bromide, edentate calcium disodium, edtic acid, eglumine, ethyl alcohol, ethylcellulose, ethyl gallate, ethyl laurate, ethyl maltol, ethyl oleate, ethylparaben, ethylparaben potassium, ethylparaben sodium, ethyl vanillin, fructose, fructose liquid, fructose milled, fructose pyrogen-free, powdered fructose, fumaric acid, gelatin, glucose, liquid glucose, glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, glycerin, glyceryl behenate, glyceryl monooleate, glyceryl monostearate, self-emulsifying glyceryl monostearate, glyceryl palmitostearate, glycine, glycols, glycofurol, guar gum, heptafluoropropane (HFC), hexadecyltrimethylammonium bromide, high fructose syrup, human serum albumin, hydrocarbons (HC), dilute hydrochloric acid, hydrogenated vegetable oil, type II, hydroxyethyl cellulose, 2 -hydroxyethyl-β-cyclodextrin, hydroxypropyl cellulose, low-substituted hydroxypropyl cellulose, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, hydroxypropyl methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, imidurea, indigo carmine, ion exchangers, iron oxides, isopropyl alcohol, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, isotonic saline, kaolin, lactic acid, lactitol, lactose, lanolin, lanolin alcohols, anhydrous lanolin, lecithin, magnesium aluminum silicate, magnesium carbonate, normal magnesium carbonate, magnesium carbonate anhydrous, magnesium carbonate hydroxide, magnesium hydroxide, magnesium lauryl sulfate, magnesium oxide, magnesium silicate, magnesium stearate, magnesium trisilicate, magnesium trisilicate anhydrous, malic acid, malt, maltitol, maltitol solution, maltodextrin, maltol, maltose, mannitol, medium chain triglycerides, meglumine, menthol, methylcellulose, methyl methacrylate, methyl oleate, methylparaben, methylparaben

potassium, methylparaben sodium, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose sodium, mineral oil, light mineral oil, mineral oil and lanolin alcohols, oil, olive oil, monoethanolamine, montmorillonite, octyl gallate, oleic acid, palmitic acid, paraffin, peanut oil, petrolatum, petrolatum and lanolin alcohols, pharmaceutical glaze, phenol, liquified phenol, phenoxyethanol, phenoxypropanol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric acetate, phenylmercuric borate, phenylmercuric nitrate, polacrilin, polacrilin potassium, poloxamer, polydextrose, polyethylene glycol, polyethylene oxide, polyacrylates, polyethylene-polyoxypropylene-block polymers, polymethacrylates, polyoxyethylene alkyl ethers, polyoxyethylene castor oil derivatives, polyoxyethylene sorbitol fatty acid esters, polyoxyethylene stearates, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, potassium alginate, potassium benzoate, potassium bicarbonate, potassium bisulfite, potassium chloride, postassium citrate, potassium citrate anhydrous, potassium hydrogen phosphate, potassium metabisulfite, monobasic potassium phosphate, potassium propionate, potassium sorbate, povidone, propanol, propionic acid, propylene carbonate, propylene glycol, propylene glycol alginate, propyl gallate, propylparaben, propylparaben potassium, propylparaben sodium, protamine sulfate, rapeseed oil, Ringer's solution, saccharin, saccharin ammonium, saccharin calcium, saccharin sodium, safflower oil, saponite, serum proteins, sesame oil, colloidal silica, colloidal silicon dioxide, sodium alginate, sodium ascorbate, sodium benzoate, sodium bicarbonate, sodium bisulfite, sodium chloride, anhydrous sodium citrate, sodium citrate dehydrate, sodium chloride, sodium cyclamate, sodium edentate, sodium dodecyl sulfate, sodium lauryl sulfate, sodium metabisulfite, sodium phosphate, dibasic, sodium phosphate, monobasic, sodium phosphate, tribasic, anhydrous sodium propionate, sodium propionate, sodium sorbate, sodium starch glycolate, sodium stearyl fumarate, sodium sulfite, sorbic acid, sorbitan esters (sorbitan fatty esters), sorbitol, sorbitol solution 70%, soybean oil, spermaceti wax, starch, corn starch, potato starch, pregelatinized starch, sterilizable maize starch, stearic acid, purified stearic acid, stearyl alcohol, sucrose, sugars, compressible sugar, confectioner's sugar, sugar spheres, invert sugar, *Sugartab*, Sunset Yellow FCF, synthetic paraffin, talc, tartaric acid, tartrazine, tetrafluoroethane (HFC), theobroma oil, thimerosal, titanium dioxide, alpha tocopherol, tocopheryl acetate, alpha tocopheryl acid succinate, beta-tocopherol, delta-tocopherol, gamma-tocopherol, tragacanth, triacetin, tributyl citrate, triethanolamine, triethyl citrate, trimethyl- -cyclodextrin, trimethyltetradecylammonium bromide, tris buffer, trisodium edentate, vanillin, type Ihydrogenated vegetable oil, water, soft water, hard water, carbon dioxide-free water, pyrogen-free water, water for injection, sterile water for

inhalation, sterile water for injection, sterile water for irrigation, waxes, anionic emulsifying wax, carnauba wax, cationic emulsifying wax, cetyl ester wax, microcrystalline wax, nonionic emulsifying wax, suppository wax, white wax, yellow wax, white petrolatum, wool fat, xanthan gum, xylitol, zein, zinc propionate, zinc salts, zinc stearate, or any excipient in the *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), which is incorporated by reference in its entirety. *Remington 's Pharmaceutical Sciences*, Sixteenth Edition, E. W. Martin (MackPublishing Co., Easton, Pa., 1980), which is incorporated by reference in its entirety, discloses various components used in formulating pharmaceutically acceptable compositions and known techniques for the preparation thereof. Except insofar as any conventional agent is incompatible with the pharmaceutical compositions, its use in pharmaceutical compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

[582] In some embodiments, the foregoing component(s) may be present in the pharmaceutical composition at any concentration, such as, for example, at least A, wherein A is 0.0001% w/v, 0.001% w/v, 0.01% w/v, 0.1% w/v, 1% w/v, 2% w/v, 5% w/v, 10% w/v, 20% w/v, 30% w/v, 40% w/v, 50% w/v, 60% w/v, 70% w/v, 80% w/v, or 90% w/v. In some embodiments, the foregoing component(s) may be present in the pharmaceutical composition at any concentration, such as, for example, at most B, wherein B is 90% w/v, 80% w/v, 70% w/v, 60% w/v, 50% w/v, 40% w/v, 30% w/v, 20% w/v, 10% w/v, 5% w/v, 2% w/v, 1% w/v, 0.1% w/v, 0.001% w/v, or 0.0001%. In other embodiments, the foregoing component(s) may be present in the pharmaceutical composition at any concentration range, such as, for example from about A to about B. In some embodiments, A is 0.0001% and B is 90%.

[583] The pharmaceutical compositions may be formulated to achieve a physiologically compatible pH. In some embodiments, the pH of the pharmaceutical composition may be at least 5, at least 5.5, at least 6, at least 6.5, at least 7, at least 7.5, at least 8, at least 8.5, at least 9, at least 9.5, at least 10, or at least 10.5 up to and including pH 11, depending on the formulation and route of administration. In certain embodiments, the pharmaceutical compositions may comprise buffering agents to achieve a physiological compatible pH. The buffering agents may include any compounds capabale of buffering at the desired pH such as, for example, phosphate buffers (e.g.,PBS), triethanolamine, Tris, bicine, TAPS, tricine, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodylate, MES, and others. In certain embodiments, the strength of the buffer is at least 0.5 mM, at least 1 mM, at least 5 mM, at least 10 mM, at least 20 mM, at least 30 mM, at least 40 mM, at least 50 mM, at least 60 mM, at least 70 mM, at

least 80 mM, at least 90 mM, at least 100 mM, at least 120 mM, at least 150 mM, or at least 200 mM. In some embodiments, the strength of the buffer is no more than 300 mM (e.g., at most 200 mM, at most 100 mM, at most 90 mM, at most 80 mM, at most 70 mM, at most 60 mM, at most 50 mM, at most 40 mM, at most 30 mM, at most 20 mM, at most 10 mM, at most 5 mM, at most 1 mM).

Routes of Administration

[584] The following discussion on routes of administration is merely provided to illustrate exemplary embodiments and should not be construed as limiting the scope in any way.

[585] Formulations suitable for oral administration can consist of (a) liquid solutions, such as an effective amount of the conjugate of the present disclosure dissolved in diluents, such as water, saline, or orange juice; (b) capsules, sachets, tablets, lozenges, and troches, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as solids or granules; (c) powders; (d) suspensions in an appropriate liquid; and (e) suitable emulsions. Liquid formulations may include diluents, such as water and alcohols, for example, ethanol, benzyl alcohol, and the polyethylene alcohols, either with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant. Capsule forms can be of the ordinary hard- or soft-shelled gelatin type containing, for example, surfactants, lubricants, and inert fillers, such as lactose, sucrose, calcium phosphate, and corn starch. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, corn starch, potato starch, alginic acid, microcrystalline cellulose, acacia, gelatin, guar gum, colloidal silicon dioxide, croscarmellose sodium, talc, magnesium stearate, calcium stearate, zinc stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, diluents, buffering agents, disintegrating agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, and other pharmacologically compatible excipients. Lozenge forms can comprise the conjugate of the present disclosure in a flavor, usually sucrose and acacia or tragacanth, as well as pastilles comprising the conjugate of the present disclosure in an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia, emulsions, gels, and the like containing, in addition to, such excipients as are known in the art.

[586] The conjugates of the disclosure, alone or in combination with other suitable components, can be delivered via pulmonary administration and can be made into aerosol formulations to be administered via inhalation. These aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like. They also may be formulated as pharmaceuticals for non-pressured preparations, such as in a nebulizer or an atomizer. Such spray formulations also may be used to spray

mucosa. In some embodiments, the conjugate is formulated into a powder blend or into microparticles or nanoparticles. Suitable pulmonary formulations are known in the art. See, e.g., Qian et al., Int J Pharm 366: 218-220 (2009); Adjei and Garren, Pharmaceutical Research, 7(6): 565-569 (1990); Kawashima et al., J Controlled Release 62(1-2): 279-287 (1999); Liu et al., Pharm Res 10(2): 228-232 (1993); International Patent Application Publication Nos. WO 2007/133747 and WO 2007/141411.

[587] Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. The term, "parenteral" means not through the alimentary canal but by some other route such as subcutaneous, intramuscular, intraspinal, or intravenous. The conjugate of the present disclosure can be administered with a physiologically acceptable diluent in a pharmaceutical carrier, such as a sterile liquid or mixture of liquids, including water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, an alcohol, such as ethanol or hexadecyl alcohol, a glycol, such as propylene glycol or polyethylene glycol, dimethylsulfoxide, glycerol, ketals such as 2,2- dimethyl-153-dioxolane-4-methanol, ethers, poly(ethyleneglycol) 400, oils, fatty acids, fatty acid esters or glycerides, or acetylated fatty acid glycerides with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant, such as a soap or a detergent, suspending agent, such as pectin, carbomers, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or carboxymethylcellulose, or emulsifying agents and other pharmaceutical adjuvants.

[588] Oils, which can be used in parenteral formulations include petroleum, animal, vegetable, or synthetic oils. Specific examples of oils include peanut, soybean, sesame, cottonseed, corn, olive, petrolatum, and mineral. Suitable fatty acids for use in parenteral formulations include oleic acid, stearic acid, and isostearic acid. Ethyl oleate and isopropyl myristate are examples of suitable fatty acid esters.

[589] Suitable soaps for use in parenteral formulations include fatty alkali metal, ammonium, and triethanolamine salts, and suitable detergents include (a) cationic detergents such as, for example, dimethyl dialkyl ammonium halides, and alkyl pyridinium halides, (b) anionic detergents such as, for example, alkyl, aryl, and olefin sulfonates, alkyl, olefin, ether, and monoglyceride sulfates, and sulfosuccinates, (c) nonionic detergents such as, for example, fatty amine oxides, fatty acid alkanolamides, and polyoxyethylenepolypropylene

copolymers, (d) amphoteric detergents such as, for example, alkyl-β-aminopropionates, and 2-alkyl -imidazoline quaternary ammonium salts, and (e) mixtures thereof.

[590] The parenteral formulations will typically contain from about 0.5% to about 25% by weight of **Ab-L-Y** conjugate of the present disclosure in solution. Preservatives and buffers may be used. In order to minimize or eliminate irritation at the site of injection, such compositions may contain one or more nonionic surfactants having a hydrophile-lipophile balance (HLB) of from about 12 to about 17. The quantity of surfactant in such formulations will typically range from about 5% to about 15% by weight. Suitable surfactants include polyethylene glycol sorbitan fatty acid esters, such as sorbitan monooleate and the high molecular weight adducts of ethylene oxide with a hydrophobic base, formed by the condensation of propylene oxide with propylene glycol. The parenteral formulations can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampoules and vials, and can be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid excipient, for example, water, for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described.

[591] Injectable formulations are in accordance with the invention. The requirements for effective pharmaceutical carriers for injectable compositions are well-known to those of ordinary skill in the art (see, e.g., *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), and *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)).

[592] Additionally, the conjugate of the present disclosures can be made into suppositories for rectal administration by mixing with a variety of bases, such as emulsifying bases or water-soluble bases. Formulations suitable for vaginal administration can be presented as pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams, or spray formulas containing, in addition to the active ingredient, such carriers as are known in the art to be appropriate.

[593] It will be appreciated by one of skill in the art that, in addition to the above- described pharmaceutical compositions, the conjugate of the disclosure can be formulated as inclusion complexes, such as cyclodextrin inclusion complexes, or liposomes.

Dose

[594] The **Ab-L-Y** conjugates of the disclosure are believed to be useful in methods of treating an immunological disease or medical. For purposes of the disclosure, the amount or

dose of the conjugate of the present disclosure administered should be sufficient to effect, e.g., a therapeutic or prophylactic response, in the subject or animal over a reasonable time frame. For example, the dose of the conjugate of the present disclosure should be sufficient to stimulate cAMP secretion from cells as described herein or sufficient to decrease blood glucose levels, fat levels, food intake levels, or body weight of a mammal, in a period of from about 1 to 4 minutes, 1 to 4 hours or 1 to 4 weeks or longer, e.g., 5 to 20 or more weeks, from the time of administration. In certain embodiments, the time period could be even longer. The dose will be determined by the efficacy of the particular conjugate of the present disclosure and the condition of the animal (e.g., human), as well as the body weight of the animal (e.g., human) to be treated.

[595] Many assays for determining an administered dose are known in the art. For purposes herein, an assay, which comprises comparing the extent to which blood glucose levels are lowered upon administration of a given dose of the conjugate of the present disclosure to a mammal among a set of mammals of which is each given a different dose of the conjugate, could be used to determine a starting dose to be administered to a mammal. The extent to which blood glucose levels are lowered upon administration of a certain dose can be assayed by methods known in the art, including, for instance, the methods described herein in the Examples section.

[596] The dose of the conjugate of the present disclosure also will be determined by the existence, nature and extent of any adverse side effects that might accompany the administration of a particular conjugate of the present disclosure. Typically, the attending physician will decide the dosage of the conjugate of the present disclosure with which to treat each individual patient, taking into consideration a variety of factors, such as age, body weight, general health, diet, sex, conjugate of the present disclosure to be administered, route of administration, and the severity of the condition being treated. By way of example and not intending to limit the invention, the dose of the conjugate of the present disclosure can be about 0.0001 to about 1 g/kg body weight of the subject being treated/day, from about 0.0001 to about 0.001 g/kg body weight/day, or about 0.01 mg to about 1 g/kg body weight/day.

[597] In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises any of the conjugates disclosed herein at a purity level suitable for administration to a patient. In some embodiments, the conjugate has a purity level of at least about 90%, about 91%, about 92%, about 93%, about 94%, about 95%, about 96%, about 97%, about 98% or about 99%, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient. The pharmaceutical composition in

some aspects comprise the conjugate of the present disclosure at a concentration of at least A, wherein A is about about 0.001 mg/ml, about 0.01 mg/ml, 0 about 1 mg/ml, about 0.5 mg/ml, about 1 mg/ml, about 2 mg/ml, about 3 mg/ml, about 4 mg/ml, about 5 mg/ml, about 6 mg/ml, about 7 mg/ml, about 8 mg/ml, about 9 mg/ml, about 10 mg/ml, about 11 mg/ml, about 12 mg/ml, about 13 mg/ml, about 14 mg/ml, about 15 mg/ml, about 16 mg/ml, about 17 mg/ml, about 18 mg/ml, about 19 mg/ml, about 20 mg/ml, about 21 mg/ml, about 22 mg/ml, about 23 mg/ml, about 24 mg/ml, about 25 mg/ml or higher. In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises the conjugate at a concentration of at most B, wherein B is about 30 mg/ml, about 25 mg/ml, about 24 mg/ml, about 23, mg/ml, about 22 mg/ml, about 21 mg/ml, about 20 mg/ml, about 19 mg/ml, about 18 mg/ml, about 17 mg/ml, about 16 mg/ml, about 15 mg/ml, about 14 mg/ml, about 13 mg/ml, about 12 mg/ml, about 11 mg/ml, about 10 mg/ml, about 9 mg/ml, about 8 mg/ml, about 7 mg/ml, about 6 mg/ml, about 5 mg/ml, about 4 mg/ml, about 3 mg/ml, about 2 mg/ml, about 1 mg/ml, or about 0.1 mg/ml. In some embodiments, the compositions may contain an conjugate at a concentration range of A to B mg/ml, for example, about 0.001 to about 30.0 mg/ml.

Targeted Forms

[598] One of ordinary skill in the art will readily appreciate that the **Ab-L-Y** conjugates of the disclosure can be modified in any number of ways, such that the therapeutic or prophylactic efficacy of the conjugate of the present disclosures is increased through the modification. For instance, the conjugate of the present disclosure can be further conjugated either directly or indirectly through a linker to a targeting moiety. The practice of conjugating compounds, e.g., glucagon conjugates described herein, to targeting moieties is known in the art. See, for instance, Wadhwa et al., J Drug Targeting, 3, 111-127 (1995) and U.S. Patent No. 5,087,616. One of ordinary skill in the art recognizes that sites on the peptide of the present disclosures (Ab), which are not necessary for the function of the peptide of the present disclosures, are ideal sites for attaching a linker and/or a targeting moiety, provided that the linker and/or targeting moiety, once attached to the peptide of the present disclosures (**Ab**), does not interfere with the function of the peptide of the present disclosures.

Controlled Release Formulations

[599] Alternatively, the glucagon conjugates described herein can be modified into a depot form, such that the manner in which the conjugate of the present disclosures is released into

the body to which it is administered is controlled with respect to time and location within the body (see, for example, U.S. Patent No. 4,450,150). Depot forms of conjugate of the present disclosures can be, for example, an implantable composition comprising the conjugate of the present disclosures and a porous or non-porous material, such as a polymer, wherein the conjugate of the present disclosures is encapsulated by or diffused throughout the material and/or degradation of the non-porous material. The depot is then implanted into the desired location within the body and the conjugate of the present disclosures are released from the implant at a predetermined rate.

[600] The pharmaceutical composition in certain aspects is modified to have any type of in vivo release profile. In some aspects, the pharmaceutical composition is an immediate release, controlled release, sustained release, extended release, delayed release, or bi-phasic release formulation. Methods of formulating peptides or conjugates for controlled release are known in the art. See, for example, Qian et al., J Pharm 374: 46-52 (2009) and International Patent Application Publication Nos. WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; and WO 1999/040942.

[601] The instant compositions may further comprise, for example, micelles or liposomes, or some other encapsulated form, or may be administered in an extended release form to provide a prolonged storage and/or delivery effect. The disclosed pharmaceutical formulations may be administered according to any regime including, for example, daily (1 time per day, 2 times per day, 3 times per day, 4 times per day, 5 times per day, 6 times per day), every two days, every three days, every four days, every five days, every six days, weekly, bi-weekly, every three weeks, monthly, or bi-monthly.

Kits

[602] The **Ab-L-Y** conjugates of the present disclosure can be provided in accordance with one embodiment as part of a kit. Accordingly, in some embodiments, a kit for administering a **Ab-L-Y** conjugate to a patient in need thereof is provided wherein the kit comprises a **Ab-L-Y** conjugate as described herein.

[603] In one embodiment the kit is provided with a device for administering the **Ab-L-Y** conjugate composition to a patient, e.g. syringe needle, pen device, jet injector or other needle-free injector. The kit may alternatively or in addition include one or more containers, e.g., vials, tubes, bottles, single or multi-chambered pre-filled syringes, cartridges, infusion pumps (external or implantable), jet injectors, pre-filled pen devices and the like, optionally containing the glucagon conjugate in a lyophilized form or in an aqueous solution. The kits

in some embodiments comprise instructions for use. In accordance with one embodiment the device of the kit is an aerosol dispensing device, wherein the composition is prepackaged within the aerosol device. In another embodiment the kit comprises a syringe and a needle, and in one embodiment the sterile glucagon composition is prepackaged within the syringe.

[604] In one embodiment the invention provides a compound of Formula (I): Ab-L-Y (I); wherein Ab comprises an anti prostate-specific membrane antigen (αPSMA) antibody or fragment thereof, further comprising a non-naturally encoded amino acid; L comprises a linker, linking group or a bond; Y comprises a nuclear receptor ligand; and wherein L is conjugated to Ab via a covalent linkage between said non-naturally encoded amino acid and L. In some embodiments, the present invention provides a compound of Formula (I): Ab-L-Y; wherein Y is an antagonist. In an additional embodiment, the present invention provides a compound of Formula (I): Ab-L-Y; wherein Y is an anti-androgenic molecule. In some embodiments, the present invention provides a compound of Formula (I): Ab-L-Y; wherein L is a cleavable, non-cleavable or degradable linker. In some embodiments, the present invention provides a compound of Formula (I): Ab-L-Y; wherein L is intracellularly cleavable or degradable. In some embodiments, the present invention provides a compound of Formula (I): Ab-L-Y; wherein the non-naturally encoded amino acid comprises a functional group selected from ketone and azide.

[605] The following examples are given merely to illustrate the present invention and not in any way to limit its scope.

EXAMPLES

Example 1: Synthesis of Compound 1

[606] 1. Detailed Synthesis of Compound 1 shown in Figure 8

1a. Synthesis of compound 1-3

[607] To a mixture of Dexamethasone 1-1 (0.4 g, 1.02 mmol) and N, N'-disuccinimidyl carbaonate (0.4 g, 1.33 mmol) in DCM (4 ml) and THF (4 ml) was added DIEA (0.36 ml, 2.04 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated and the crude product was purified by column chromatography. 0.13 g of 1-3 was obtained as white solid (24 %). LCMS m/z = 534 [M+H]+

1b. Synthesis of compound 1-7

[608] To a mixture of 1-4 (0.3 g, 0.6 mmol), 1-5 (0.12 g , 0.66 mmol) and EDC (0.2 g, 1.2 mmol) in DMF (6 ml) was added 1N NaHCO3 (1.8 mmol) solution at 0oC. The mixture was

stirred at room temperature overnight. It was extracted with EtOAc (3x 30 ml). eashed with 0.5M HCl and brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO4. It was filtered and concentrated under reduced pressure to give the product 1-6 as white solid.

[609] A mixture of 1-6 (0.1 g) and 4N HCl in dioxane (1 ml) was stirred at room temperature for 1 hour. It was concentrated under reduced pressure to give the product 1-7 as white solid. The product was used without further purification. LCMS m/z = 553 [M+H]+

1c. Synthesis of compound 1-9

[610] To a mixture of 1-3 (0.1 g, 0.18 mmol) and 1-7 (99.8 mg, 0.18 mmol) in DMF (3 ml) was added DIEA (0.16 ml, 0.9 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The crude product was purified by prep HPLC to give 65 mg of 1-8. It was dissolve into THF (1 ml) and Et2NH was added at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours and it was concentrated under reduced pressure to give the product 1-9 as white solid. The product was used without further purification. LCMS m/z = 749 [M+H]+

1d. Synthesis of compound 1-12

[611] To a mixture of 1-9 (22 mg, 0.029 mmol) and 1-10 (16.4 mg, 0.032 mmol) in DMF (3 ml) was added DIEA (0.16 ml, 0.9 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The crude product was purified by prep HPLC to give 15 mg of 1-11. LCMS m/z = 1142 [M]+

[612] 1-11 was dissolved into DMF (1 ml) and NH2NH2 (6.3 mg) was added at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours and it was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by prep HPLC. 3 mg of 1-12 was obtained as white solid. LCMS m/z = 1012 [M]+

Example 2: Synthesis of Compound 2

[613] 2. Detailed Synthesis of Compound 1 shown in Figure 9

2a. Synthesis of compound 2-2

[614] To a mixture of 1-3 (0.1 g, 0.19 mmol) and tert-butyl 2-aminoethylcarbamate (30 mg, 0.19 mmol) in acetonitrile (2 ml) was added DIEA (0.098 ml, 0.56 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The white precipitate was filtered and washed with ether to give the product 2-1 as white solid.

[615] A mixture of 2-1 (0.1 g) and 4N HCl in dioxane (1 ml) was stirred at room temperature for 1 hour. It was concentrated under reduced pressure to give the product 2-2 as white solid. The product was used without further purification. LCMS m/z = 479 [M+H]+

2b. Synthesis of compound 2-4

[616] To a mixture of 2-2 (0.09 g, 0.188 mmol) and Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (0.159 g, 0.21 mmol) in DMF (1 ml) was added DIEA (0.16 ml, 0.94 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The crude product was purified by HPLC to give 0.1 g of 2-3 as white solid.

[617] To a mixture of 2-3 (67 mg, 0.061 mmol) in THF (1 ml) was added Et2NH at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours and it was concentrated under reduced pressure and washed with ether. The product 2-4 was used without further purification. LCMS m/z = 884 [M]+

2c. Synthesis of compound 2-6

[618] To a mixture of 2-4 (50 mg, 0.057 mmol) and NaOAc (36.7 mg, 0.45 mmol) in MeOH (3 ml) was added (9H-fluoren-9-yl)methyl 2-oxoethylcarbamate (19 mg, 0.068 mmol) at 0oC. The mixture was stirred at 0oC for 0.5 hour. NaCNBH3 (9.2 mg, 0.15 mmol) was added. The mixture was stirred at 0oC for another 15 minutes and was allowed to warm to room temperature for 4 hours. The reaction mixture was concentrated and purified by HPLC to 2-5 as white solid.

[619] To a mixture of 2-5 (25 mg, 0.022 mmol) in THF (1 ml) was added Et2NH (31.8 mg, 0.44 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours and it was concentrated under reduced pressure and washed with ether. The product 2-6 was used without further purification. LCMS m/z = 927 [M]+

2d. Synthesis of compound 2-7

[620] To a mixture of 2-6 (14 mg, 0.015 mmol) and perfluorophenyl 2-(cyclooct-2-ynyloxy) acetate (5.2 mg, 0.015 mmol) in DMF (1 ml) was added DIEA (13 □l, 0.075 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The crude product was purified by HPLC to give 4 mg of 2-7 as white solid. LCMS m/z = 1091 [M]+

Example 3: Synthesis of Compound 3

[621] 3. Detailed Synthesis of Compound 3 shown in Figure 10.

3a. Synthesis of compound 3-1

[622] To the solution of compound 3 (600mg, 1.125 mmol) in 0.5 mL of DMF was added tert-butyl methyl (2-(methylamino) ethyl)carbamate (127 mg, 0.675 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2hrs. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with H2O, brine, dried over Na2SO4, and then concentrated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography to give 170mg of compound 3-1. MS (ESI) m/z 607 [M+H].

3b. Synthesis of compound 3-2

[623] Compound 3-1 (170mg) was treated with 50% TFA in DCM. The reaction was concentrated to dry after 30min. The product was directly used in next step without further purification.

3c. Synthesis of compound 3-3

[624] To the solution of compound 3-3 (0.28 mmol) in 1.5 mL of DMF was added Fmoc-Val-Cit-PAB-OPNP (215 mg, 0.28 mmol), HOBt (21.4mg, 0.14mmol) and DIEA (99□l, 0.56mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2hrs. The reaction mixture was purified by HPLC to give 270mg of compound 3-3. MS (ESI) m/z 912 [M+H].

3d. Synthesis of compound 3-4

[625] Compound 3-3 (270mg) was dissolved in 15mL THF and 2 mL DMF. 5mL of diethylamine was added to get a clear solution. The reaction was done in 1 hr. The reaction mixture was concentrated and purified by HPLC to get 180mg of compound 3-4.

3e. Synthesis of compound 3-5

[626] To the solution of compound 3-4 (180mg, 0.1974 mmol) in 1.5 mL of MeOH was added NaOAc (164mg, 2 mmol) at 0oC, followed by (9H-Fluoren-9-yl)methyl methyl 2-oxoethylcarbamate (59 mg, 0.2 mmol). The resulting solution was stirred at 0oC for 30min. 11mg of NaBH3CN was added at 0oC. The reaction mixture was stirred at 0oC for 30min and room temperature for 1 hr. The crude product was purified by HPLC to get 150mg of compound 3-5. MS (ESI) m/z 1192 [M+H]

3f. Synthesis of compound 3-6

[627] Compound 3-5 (150mg) was dissolved in 15mL THF and 2 mL DMF. 5mL of diethylamine was added to get a clear solution. The reaction was done in 1 hr. The reaction mixture was concentrated and purified by HPLC to get 110mg of compound 3-6. MS (ESI) m/z 969 [M+H]

3g. Synthesis of compound 3-7

[628] To the solution of compound 3-6 (110mg, 0.114 mmol) in 1.5 mL of MeOH was added NaOAc (93.5mg, 1.14mmol) at 0oC, followed by (9H-Fluoren-9-yl)methyl 2-oxoethylcarbamate (32 mg, 0.114 mmol). The resulting solution was stirred at 0oC for 30min. 7mg of NaBH3CN was added at 0oC. The reaction mixture was stirred at 0oC for 30min and room temperature for 1 hr. The crude product was purified by HPLC to get 40mg of compound 3-7. MS (ESI) m/z 1235 [M+H]

3h. Synthesis of compound 3-8

[629] Compound 3-7 (40mg) was dissolved in 15mL THF and 2 mL DMF. 5mL of diethylamine was added to get a clear solution. The reaction was done in 1 hr. The reaction mixture was concentrated and purified by HPLC to get 12mg of compound 3-8. MS (ESI) m/z 1012 [M+H], 507 [M+2H]

3i. Synthesis of compound 3-9

[630] To the solution of compound 3-8 (12mg) in 1 mL DMF was added perfluorophenyl 2-(cyclooct-2-ynyloxy)acetate 4.5mg. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2hrs and purified by HPLC to get 13mg of compound 3-9. MS (ESI) m/z 1177 [M+H], 589 [M+2H].

Example 4: Synthesis of Compound 4

[631] 4. Detailed Synthesis of Compound 4 shown in Figure 11.

4a. Synthesis of compound 4-2

[632] The reaction mixture of FK506 (140mg, 0.17mmol) in dichloromethane (4 mL) was treated with 4-DMAP (82mg, 0.67mmol). The solution of triphosgene (20mg) in dichloromethane (2mL) was slowly added at -78 oC (dry ice + acetone bath). The reaction mixture was stirred at -78 oC for 1 hour. Compound 4-1 (45 mg, 0.2mmol) in dichloromethane (1.5mL) was slowly added at -78 oC. After addition, the reaction was stirred at -78 oC for 1hour and then gradually increases to room temperature. The reaction mixture was treated with 1N HCl to adjust pH to 2. The reaction mixture was purified by prep-HPLC to get 35mg of compound 4-2. MS (ESI) m/z 1051 [M+H]

4b. Synthesis of compound 4-4

[633] The reaction mixture of compound 4-2 (11mg) in DMF (1mL) was treated with active ester 4-3 (6.96mg, 0.02mmol) and DIEA (2.4uL). The reaction was stirred at 0 oC for 1 hour and then increase to room temperature. The reaction mixture was adjust pH=2 and purified by prep-HPLC to give 9.1 mg of compound 4-4. MS (ESI) m/z 1215 [M+H]

Example 5: Synthesis of Compound 5

[634] 5. Detailed Synthesis of Compound 4 shown in Figure 12.

5a. Synthesis of compound 5-2

[635] The reaction mixture of FK506 (140mg, 0.17mmol) in dichloromethane (4 mL) was treated with 4-DMAP (82mg, 0.67mmol). The solution of triphosgene (20 mg, 0.051 mmol) in dichloromethane (2mL) was slowly added at -78 oC (dry ice + acetone bath). The reaction mixture was stirred at -78 oC for 1 hour. Compound 5-1 (45 mg, 0.2mmol) in dichloromethane (1.5mL) was slowly added at -78 oC. After addition, the reaction was stirred at -78 oC for 1hour and then gradually increases to room temperature. The reaction mixture was treated with 1N HCl to adjust pH to 2. The reaction mixture was purified by prep-HPLC to give 78.3mg of compound 5-2. MS (ESI) m/z 1375 [M+H]

5b. Synthesis of compound 5-3

[636] The reaction mixture of compound 5-2 (34.4mg, 0.023 mmol) in DMF (1mL) was treated with active ester (8mg and 6mg two portion) and DIEA (11.4uL). The reaction was stirred at 0oC for 1 hour and then increase to room temperature. The reaction mixture was adjust pH=2 and purified by prep-HPLC to give 11.1 mg of compound 5-3. MS (ESI) m/z 1539 [M+H]

Example 6: Synthesis of Compound 6

[637] 6. Detailed Synthesis of Compound 6 shown in Figure 13.

6a. Synthesis of compound 6-2

[638] To a mixture of Dasatinib 6-1 (0.1 g, 0.20 mmol) and N, N'-disuccinimidyl carbaonate (0.102 g, 0.41 mmol) in DCM (8 ml) was added DIEA (0.11 ml, 0.61 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated and the crude product was purified by column chromatography to give 6-2 as white solid. LCMS m/z = 629 [M]+

6b. Synthesis of compound 6-5

[639] To a mixture of 6-2 (50 mg, 0.079 mmol) and 6-3 (29.6 mg, 0.087 mmol) in DCM (5 ml) was added DIEA (0.041ml, 0.24 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. The crude product was purified by HPLC to give product 6-4 as white solid. (56 %) LCMS m/z = 852 [M]+

[640] 6-4 (38 mg, 0.045 mmol) was dissolve into DMF (1 ml) and NH2NH2 (14.4 mg) was added at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours and it was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by prep HPLC. 8 mg of 6-5 was obtained as white solid. LCMS m/z = 722 [M]+

Example 7: αPSMA-anti-androgenic conjugate 72h Prostate Cancer Cell Line Viability Study

[641] Anti-tumor efficacy of αPSMA-anti-androgenic conjugate is tested on prostate cancer cell lines LNCaP and MDA-PCa-2b. The two prostate cancer cell lines and PC-3 cells, used as negative control, are cultured and then treated either with αPSMA-anti-androgenic conjugate, the antibody alone, the anti-androgenic compound alone, and 72 hours following treatment cell viability is measured using the Dojindo cell counting kit-8 (WST-8 based).

Example 8: Human Clinical Trial of αPSMA-anti-androgenic conjugate

[642] Human Clinical Trial of the Safety and/or Efficacy of αPSMA-anti-androgenic conjugate for Prostate Cancer Therapy

[643] Objective: To compare the safety and pharmacokinetics of administered composition comprising αPSMA-anti-androgenic conjugate.

[644] Study Design: This study will be a Phase I, single-center, open-label, randomized dose escalation study followed by a Phase II study in prostate cancer patients. Patients should not have had exposure to αPSMA-anti-androgenic conjugate prior to the study entry. Patients must not have received treatment for their cancer within 2 weeks of beginning the trial. Treatments include the use of chemotherapy, hematopoietic growth factors, and biologic therapy such as monoclonal antibodies. Patients must have recovered from all toxicities (to grade 0 or 1) associated with previous treatment. All subjects are evaluated for safety and all blood collections for pharmacokinetic analysis are collected as scheduled. All studies are performed with institutional ethics committee approval and patient consent.

[645] Phase I: Patients receive i.v. αPSMA-anti-androgenic conjugate on days 1, 8, and 15 of each 28-day cycle. Doses of αPSMA-anti-androgenic conjugate may be held or modified for toxicity based on assessments as outlined below. Treatment repeats every 28 days in the absence of unacceptable toxicity. Cohorts of 3-6 patients receive escalating doses of αPSMA-anti-androgenic conjugate until the maximum tolerated dose (MTD) for αPSMA-anti-androgenic conjugate is determined. The MTD is defined as the dose preceding that at

which 2 of 3 or 2 of 6 patients experience dose-limiting toxicity. Dose limiting toxicities are determined according to the definitions and standards set by the National Cancer Institute (NCI) Common Terminology for Adverse Events (CTCAE) Version 3.0 (August 9, 2006).

[646] Phase II: Patients receive αPSMA-anti-androgenic conjugate as in phase I at the MTD determined in phase I. Treatment repeats every 4 weeks for 2-6 courses in the absence of disease progression or unacceptable toxicity. After completion of 2 courses of study therapy, patients who achieve a complete or partial response may receive an additional 4 courses. Patients who maintain stable disease for more than 2 months after completion of 6 courses of study therapy may receive an additional 6 courses at the time of disease progression, provided they meet original eligibility criteria.

[647] Blood Sampling: serial blood is drawn by direct vein puncture before and after administration of αPSMA-anti-androgenic conjugate. Venous blood samples (5 mL) for determination of serum concentrations are obtained at about 10 minutes prior to dosing and at approximately the following times after dosing: days 1, 8, and 15. Each serum sample is divided into two aliquots. All serum samples are stored at -20°C. Serum samples are shipped on dry ice.

[648] Pharmacokinetics: Patients undergo plasma/serum sample collection for pharmacokinetic evaluation before beginning treatment and at days 1, 8, and 15. Pharmacokinetic parameters are calculated by model independent methods on a Digital Equipment Corporation VAX 8600 computer system using the latest version of the BIOAVL software. The following pharmacokinetics parameters are determined: peak serum concentration (C_{max}); time to peak serum concentration (t_{max}); area under the concentration-time curve (AUC) from time zero to the last blood sampling time (AUC_{0-72}) calculated with the use of the linear trapezoidal rule; and terminal elimination half-life ($t_{1/2}$), computed from the elimination rate constant. The elimination rate constant is estimated by linear regression of consecutive data points in the terminal linear region of the log-linear concentration-time plot. The mean, standard deviation (SD), and coefficient of variation (CV) of the pharmacokinetic parameters are calculated for each treatment. The ratio of the parameter means (preserved formulation/non-preserved formulation) is calculated.

[649] Patient Response to combination therapy: Patient response is assessed via imaging with X-ray, CT scans, and MRI, and imaging is performed prior to beginning the study and at the end of the first cycle, with additional imaging performed every four weeks or at the end of subsequent cycles. Imaging modalities are chosen based upon the cancer type and

feasibility/availability, and the same imaging modality is utilized for similar cancer types as well as throughout each patient's study course. Response rates are determined using the RECIST criteria. (Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 2000 Feb 2; 92(3):205-16; http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf). Patients also undergo cancer/tumor biopsy to assess changes in progenitor cancer cell phenotype and clonogenic growth by flow cytometry, Western blotting, and IHC, and for changes in cytogenetics by FISH. After completion of study treatment, patients are followed periodically for 4 weeks.

[650] Assays for nuclear receptor activity are known throughout the art. Nuclear receptor activity assays include, but are not limited to, Life Technologies GeneBLAzer®TR alpha DA(Division Arrested) cells and TR alpha-UAS-bla HEK 293T cells contain the ligand-binding domain (LBD) of the human Thyroid hormone receptor alpha(TR alpha) fused to the DNA-binding domain of GAL4 stably integrated in the GeneBLAzer®UAS-bla HEK 293T cell line. GeneBLAzer®UAS-bla HEK 293T cells stably express a beta-lactamase reporter gene under the transcriptional control of an upstream activator sequence (UAS). When an agonist binds to the LBD of the GAL4 (DBD)-TR alpha (LBD) fusion protein, the protein binds to the UAS, resulting in expression of beta-lactamase. Division Arrested (DA) cells are available in two configurations- an Assay Kit (which includes cells and sufficient substrate to analyze 1 x 384-well plate), and a tube of cells sufficient to analyze 10 x 384-well plates. DA cells are irreversibly division arrested using a low-dose treatment of Mitomycin-C, and have no apparent toxicity or change in cellular signal transduction.

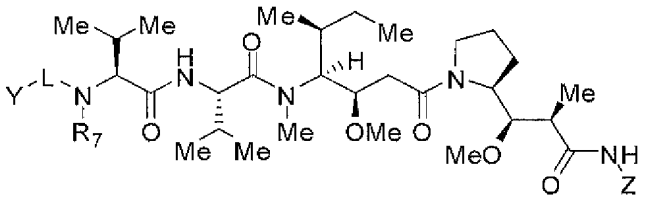
[651] TR alpha-UAS-bla HEK 293T cells contain the ligand-binding domain (LBD) of the human Thyroid hormone receptor alpha(TR alpha) fused to the DNA-binding domain of GAL4 stably integrated in the GeneBLAzer®UAS-bla HEK 293T cell line. GeneBLAzer®UAS-bla HEK 293T cells stably express a beta-lactamase reporter gene under the transcriptional control of an upstream activator sequence (UAS). When an agonist binds to the LBD of the GAL4 (DBD)-TR alpha (LBD) fusion protein, the protein binds to the UAS, resulting in expression of beta-lactamase. TR alpha-UASbla HEK 293T 293 cells are functionally validated for Z' and EC50 concentrations of T3 Thryoid hormone; TR beta-UAS-bla HEK 293T cells contain the ligand-binding domain (LBD) of the human Thyroid hormone receptor beta(TR beta) fused to the DNA-binding domain of GAL4 stably integrated in the GeneBLAzer®UASbla HEK 293T cell line. GeneBLAzer®UAS-bla HEK 293T cells stably express a betalactamase reporter gene under the transcriptional control of an upstream activator sequence (UAS). When an agonist binds to the LBD of the GAL4 (DBD)-TR beta

(LBD) fusion protein, the protein binds to the UAS, resulting in expression of beta-lactamase. Division Arrested (DA) cells are available in two configurations- an Assay Kit (which includes cells and sufficient substrate to analyze 1 x 384-well plate), and a tube of cells sufficient to analyze 10 x 384-well plates; and the Silencer® Select Human Nuclear Hormone Receptor siRNA Library V4, as well as numerous other biochemical nuclear receptor assays and cell-based nuclear receptor reporter assays that are commercially available.

[652] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to those of ordinary skill in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, patent applications, and/or other documents cited in this application are incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent, patent application, and/or other document were individually indicated to be incorporated by reference for all purposes.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound of Formula (I):



(I)

;

wherein Y comprises an anti prostate-specific membrane antigen (anti-PSMA) antibody or fragment thereof, further comprising a non-naturally encoded amino acid;

L comprises a linker, linking group or a bond;

and wherein L is conjugated to Ab via a covalent linkage between said non-naturally encoded amino acid and L.

2. The compound of claim 1 wherein Y is an antagonist.

3. The compound of claim 2 wherein Y is an anti-androgenic molecule.

4. The compound of claim 1 wherein L is a cleavable, non-cleavable or degradable linker.

5. The compound of claim 1 wherein L is intracellularly cleavable or degradable.

6. The compound of claim 1 wherein the non-naturally encoded amino acid comprises a functional group selected from ketone and azide.

Figure 1

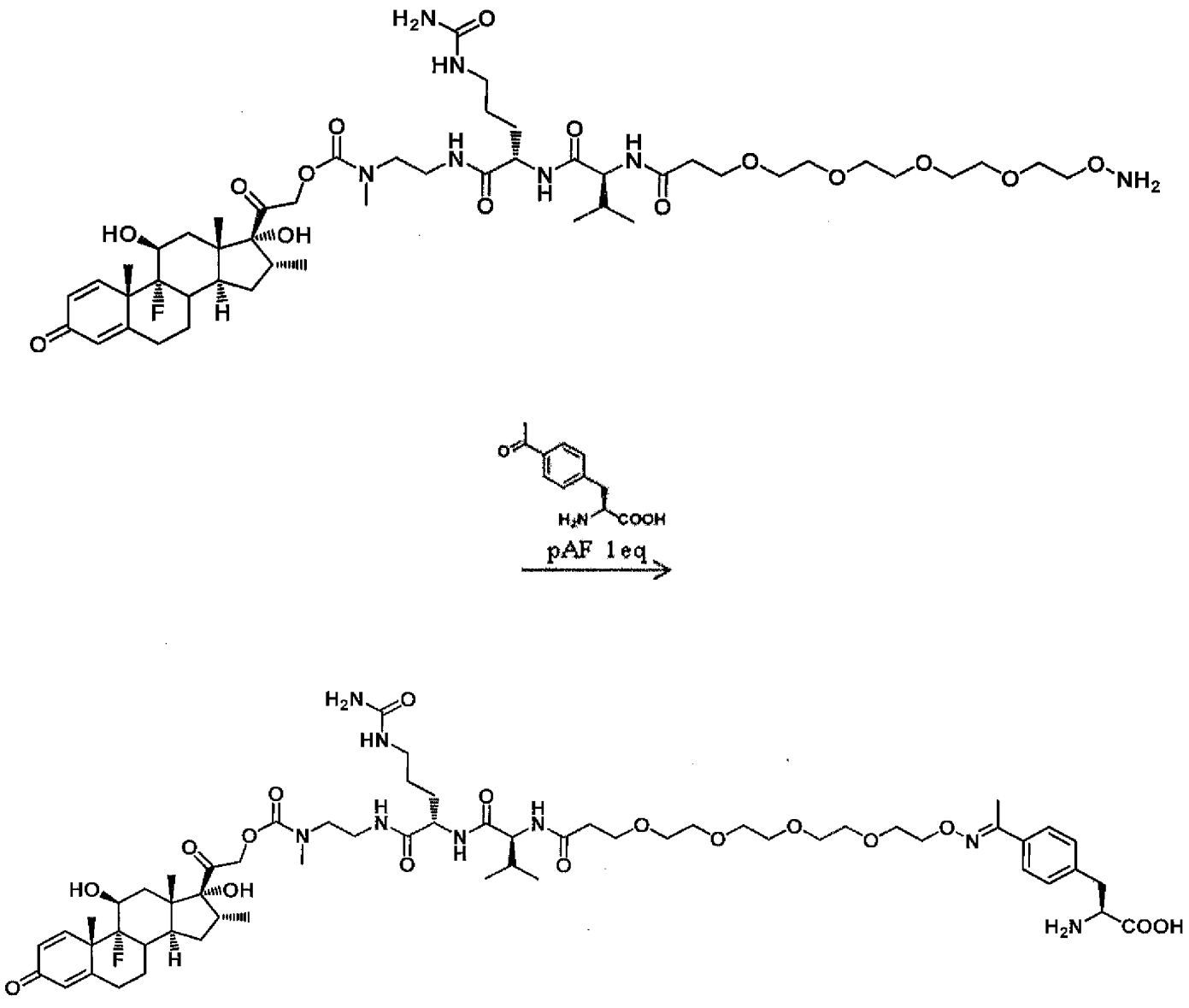
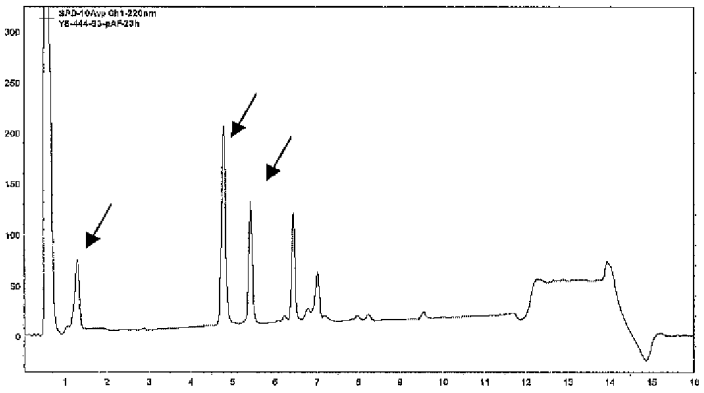
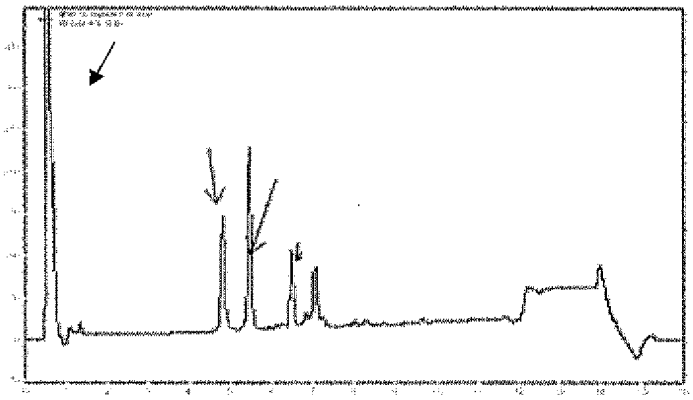


Figure 2

A.



B.



C.

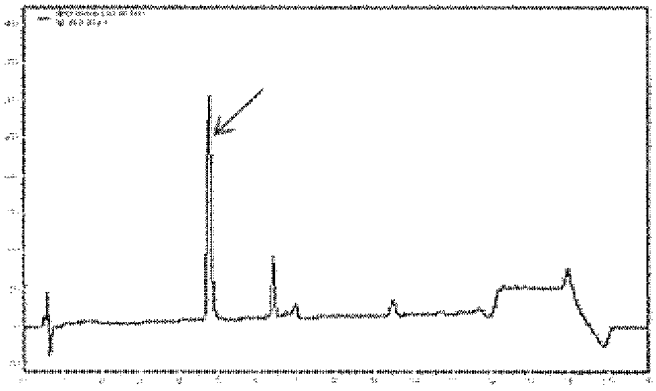
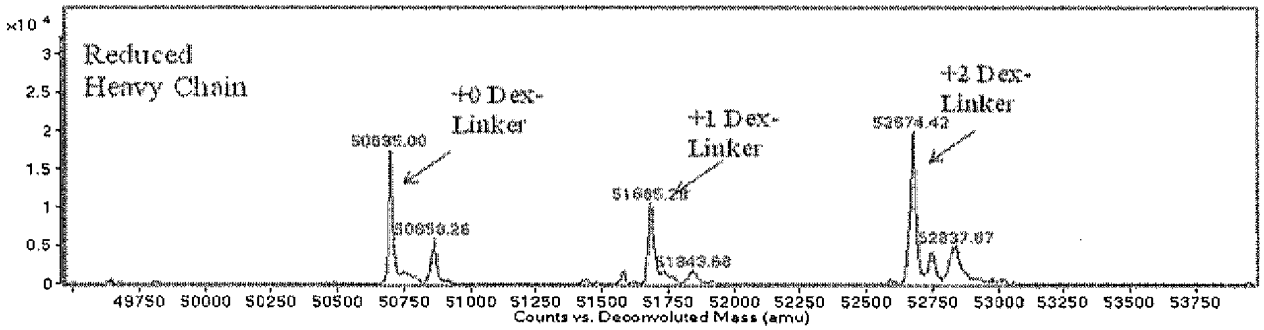


Figure 3

A.


x10 4
Reduced
Heavy Chain
+0 Dex-
Linker
+1 Dex-
Linker
+2 Dex-
Linker
50635.00
50850.26
51685.28
51843.68
52874.42
52837.07
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

B.

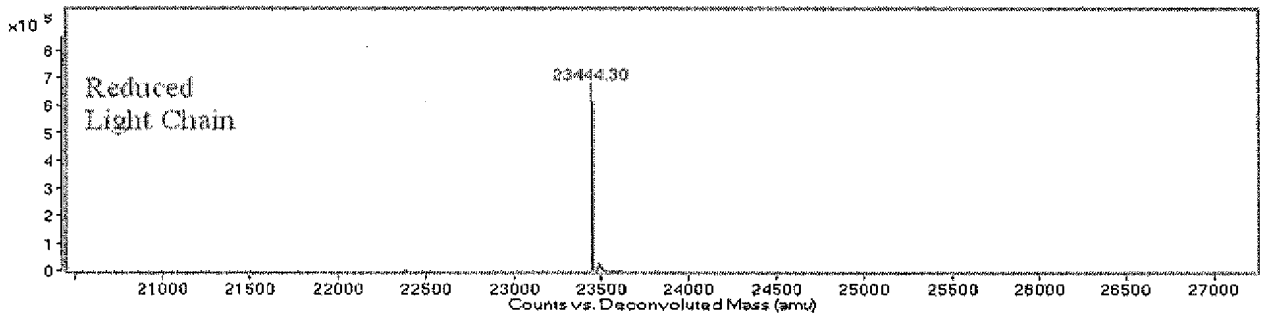
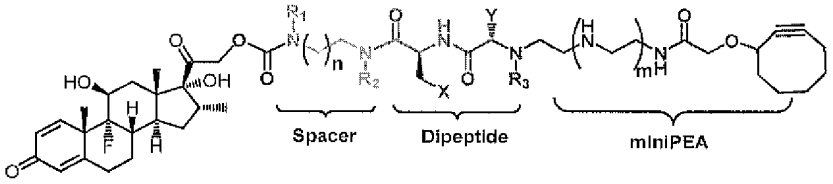

x10 5
Reduced
Light Chain
23444.30
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

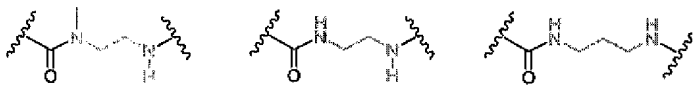
Figure 4



R1, R2, R3= H, CH3
n= 1, 2
m= 0, 1

1. Evaluation of spacers: R1, R2 = H, CH3
n= 1, 2

1st run examples:



2. Evaluation of dipeptides with fixed miniPEA linker:

Val-Cit, Val/Phe-Lys, Val-Glu, Val-Asp

1st run examples:

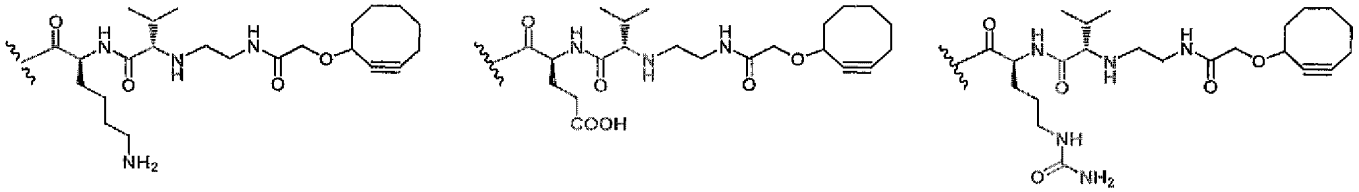


Figure 5

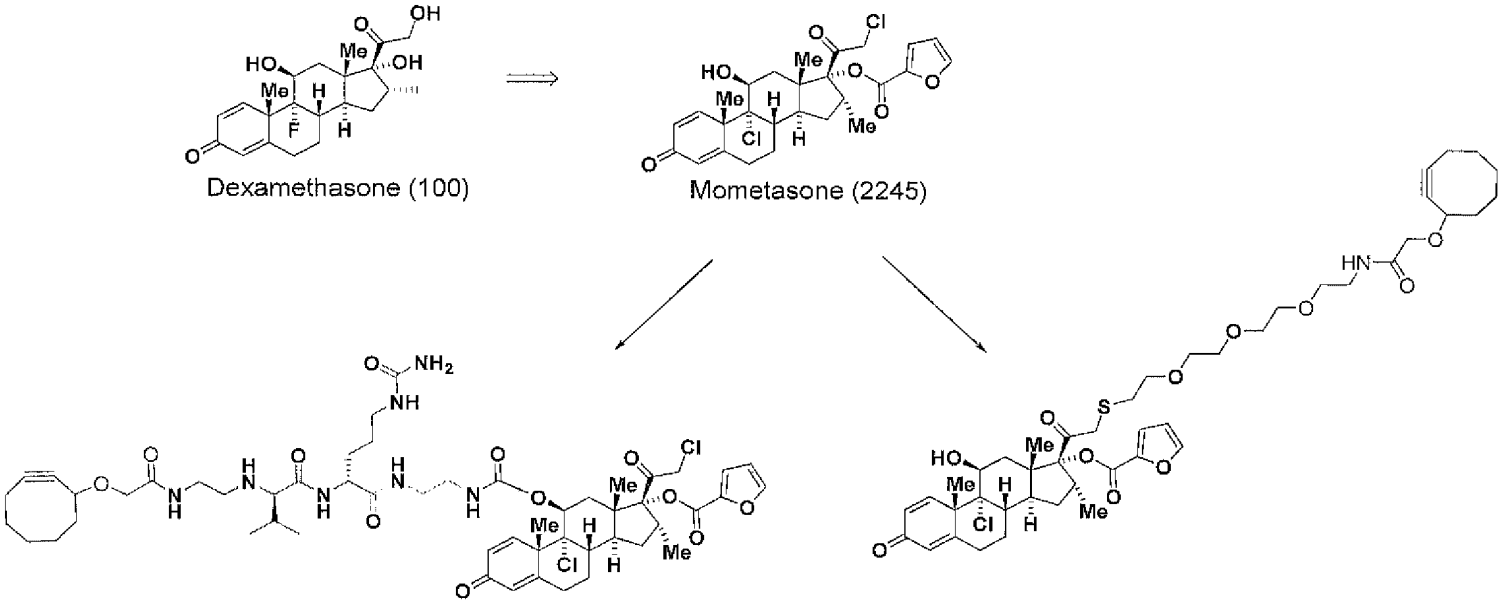


Figure 6

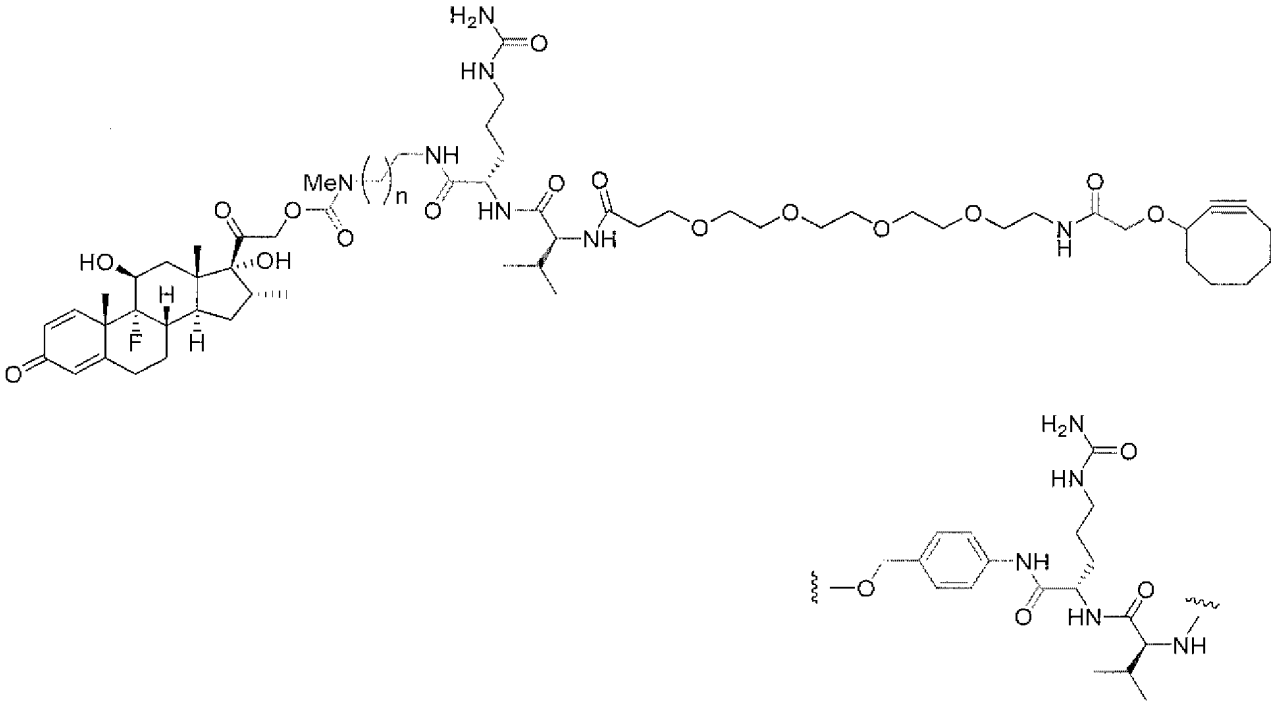


Figure 7

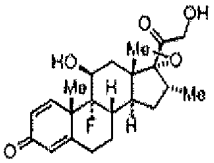
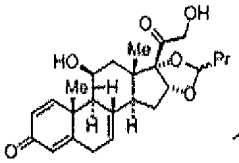
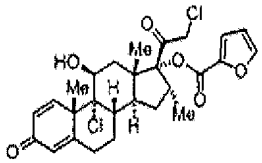
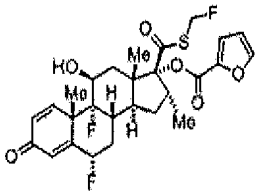
	Dexamethasone	Budesonide	Mometasone furoate	Fluticasone furoate
				
Receptor affinity:	100	855	2245	2989

Figure 8

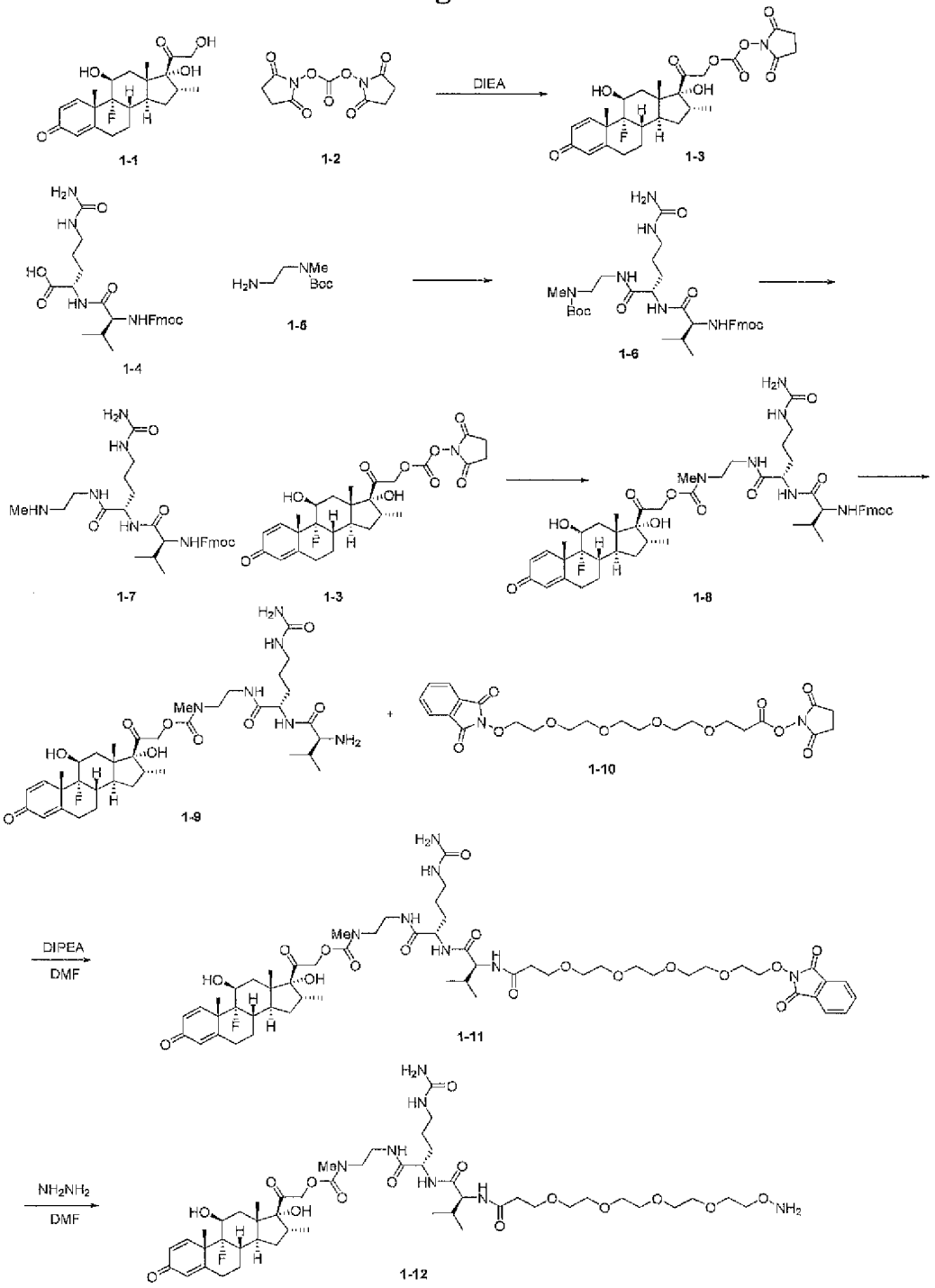


Figure 9

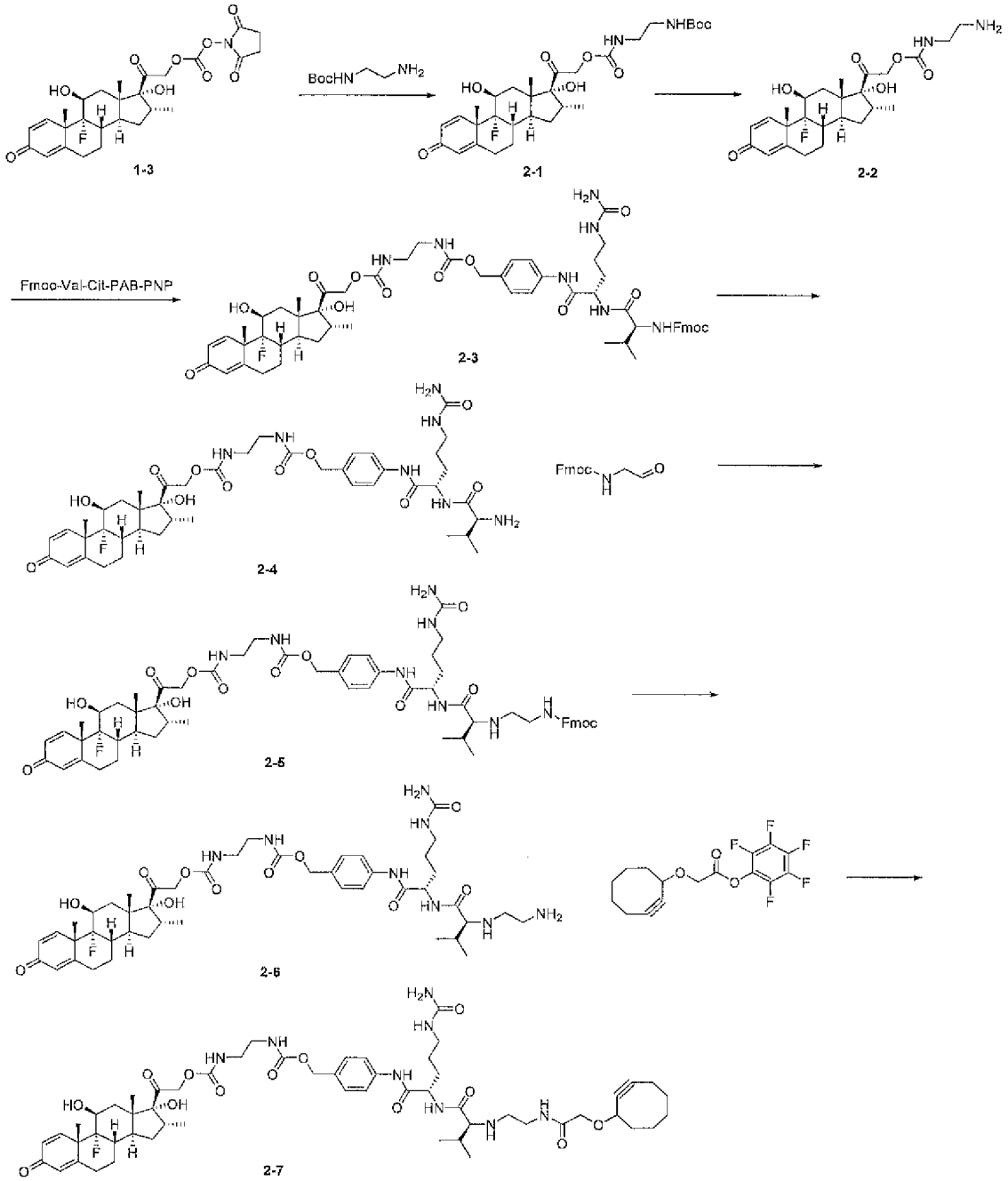


Figure 10

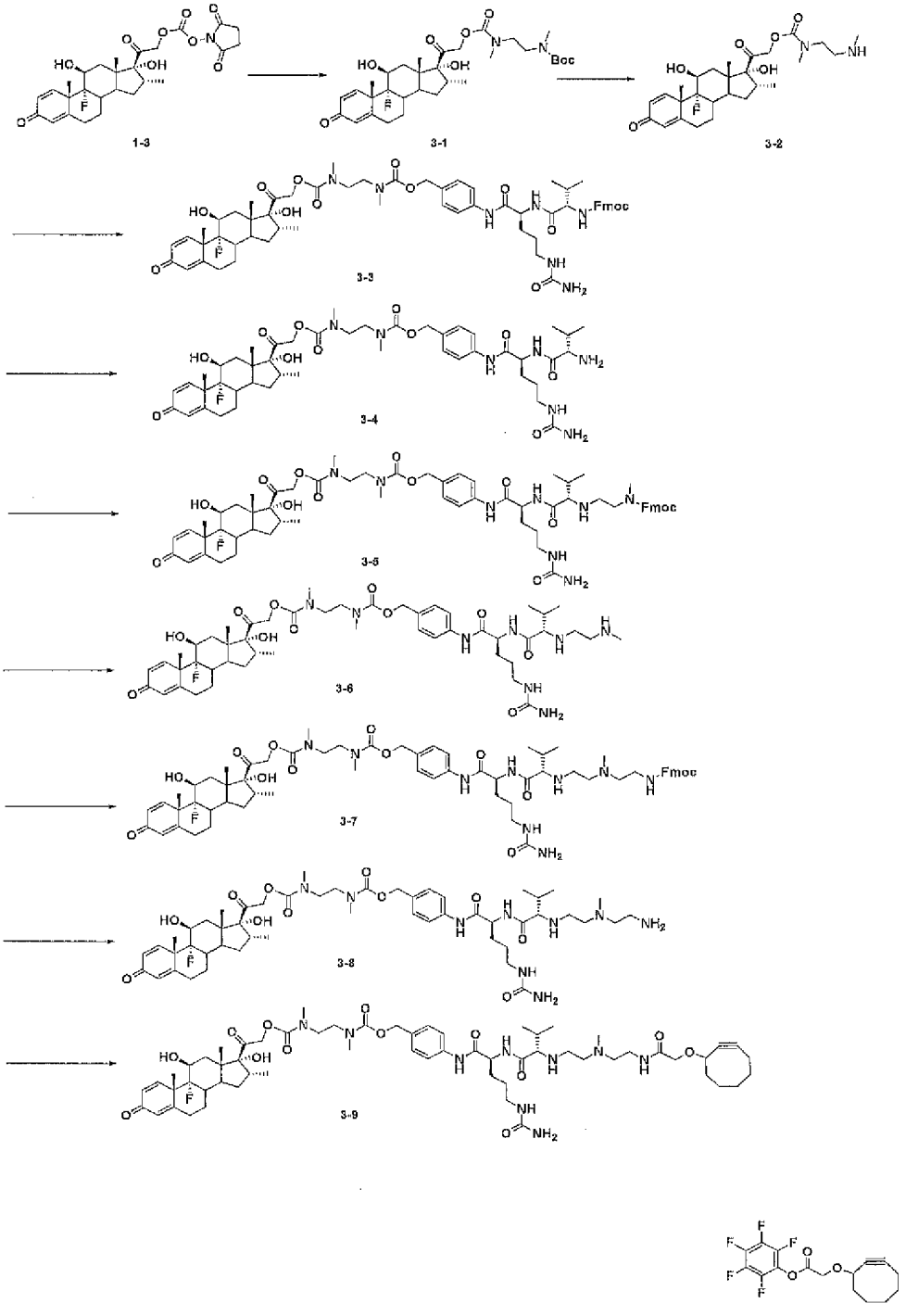


Figure 11

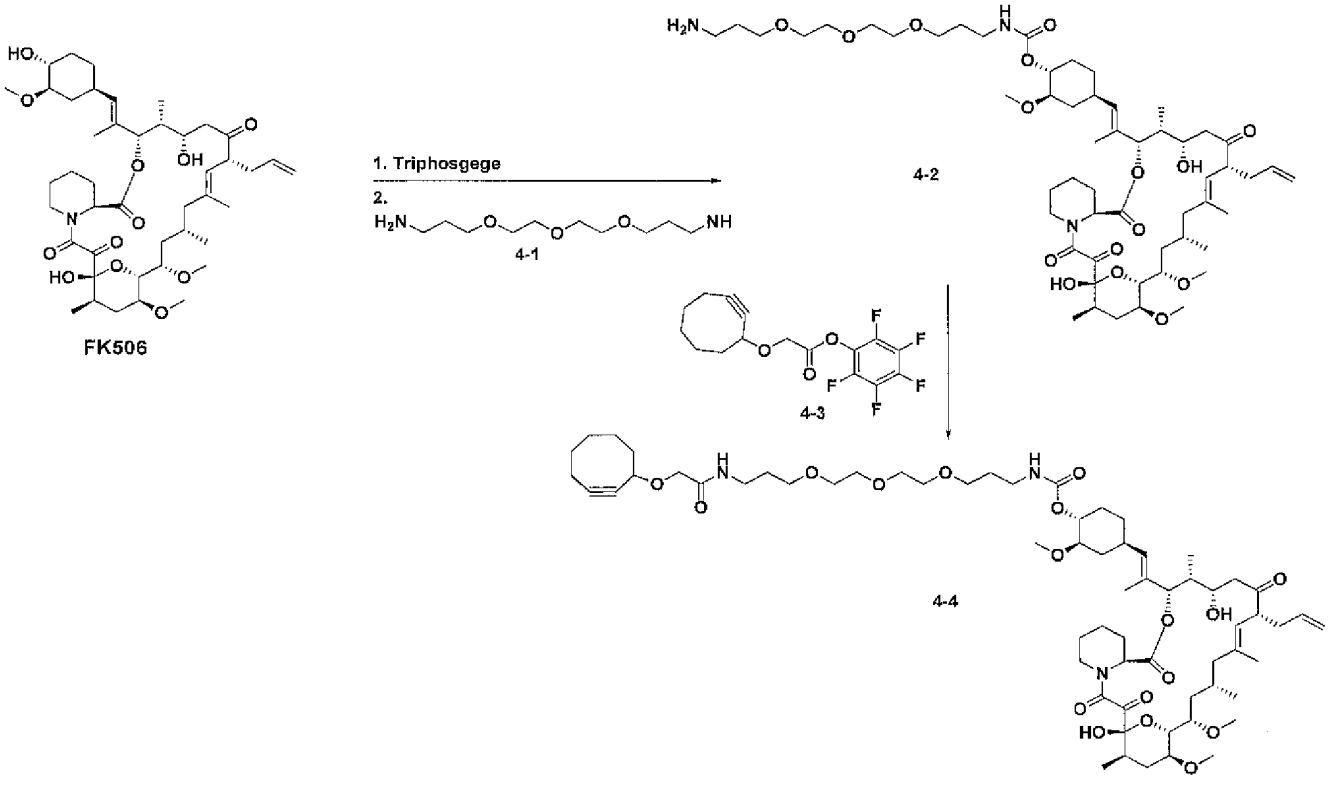


Figure 12

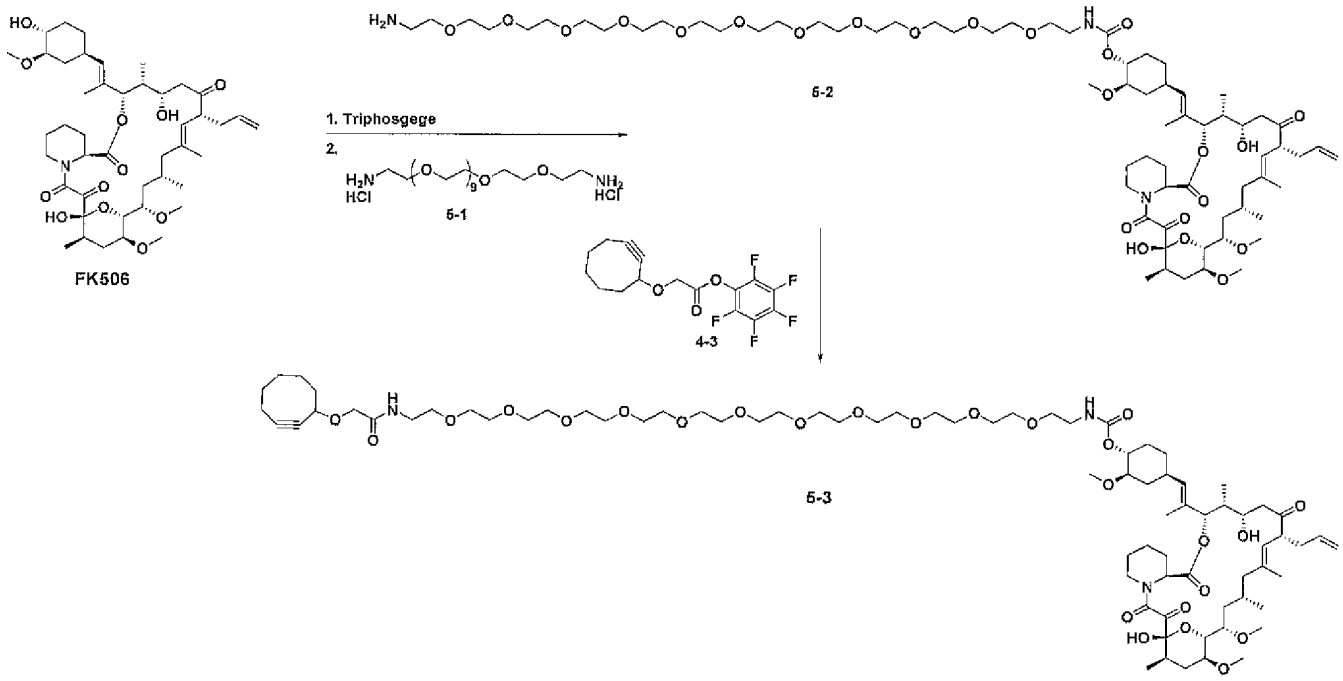
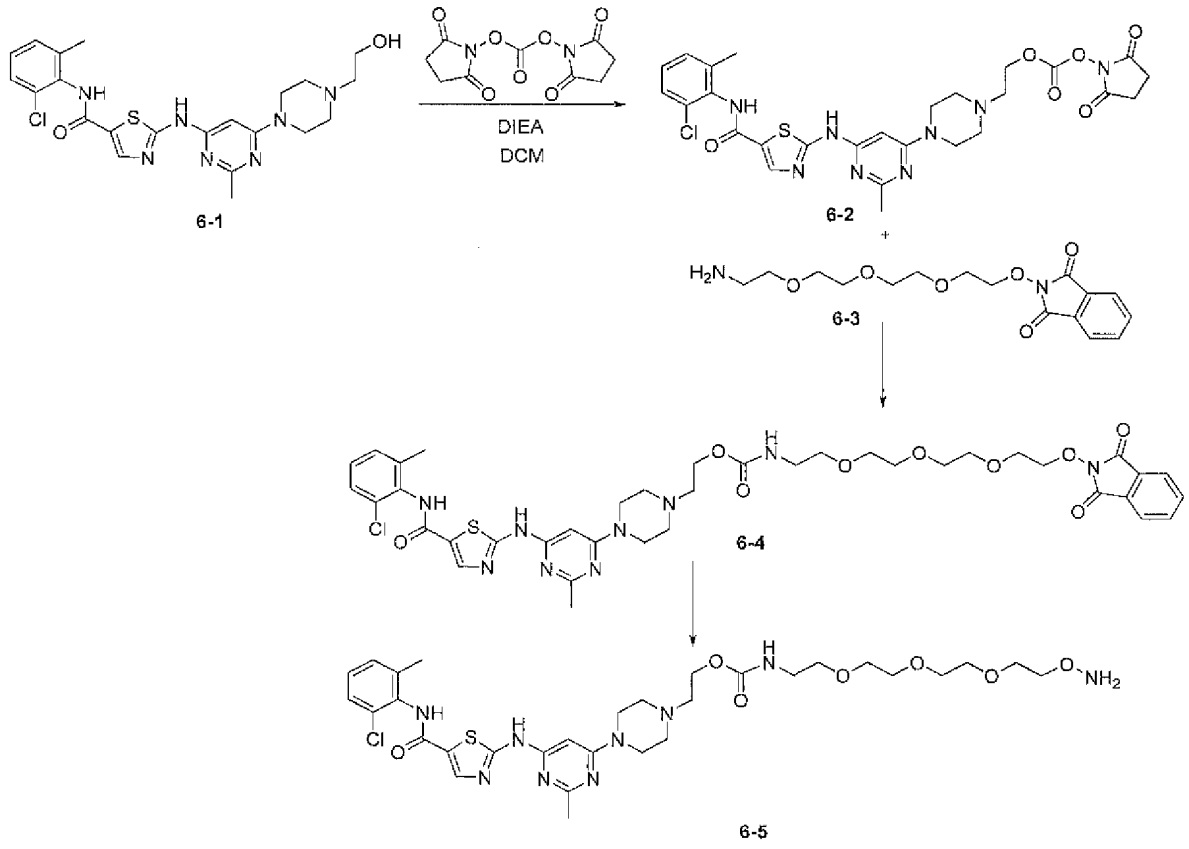


Figure 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No Ex. 1038
PCT/US2013/045834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 C07K16/30
ADD.

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)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/002222 A2 (PSMA DEV COMPANY LLC [US]; MA DANGSHE [US]; MADDON PAUL J [US]; OLSON) 4 January 2007 (2007-01-04) claim 1; figure 6	1-6
Y	WO 2005/003294 A2 (SCRIPPS RESEARCH INST [US]; DEITERS ALEXANDER [US]; CROPP ASHTON T [US) 13 January 2005 (2005-01-13) paragraph [0220]	1-6
X,P	WO 2012/166559 A1 (AMBRX INC [US]; MIAO ZHENWEI [US]; ATKINSON KYLE C [US]; BIROC SANDRA) 6 December 2012 (2012-12-06) claims 36,39	1-6

☐ 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
4 September 2013	10/09/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schleifenbaum, A

1

OnCusp

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No Ex. 1038
PCT/US2013/045834

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007002222 A2	04-01-2007	AU 2006262231 A1	04-01-2007
		BR PI0612529 A2	23-11-2010
		CA 2612762 A1	04-01-2007
		CN 101287498 A	15-10-2008
		CN 103127523 A	05-06-2013
		EP 1912677 A2	23-04-2008
		JP 2008546792 A	25-12-2008
		JP 2013100314 A	23-05-2013
		KR 20080031296 A	08-04-2008
		NZ 565075 A	27-05-2011
		US 2007160617 A1	12-07-2007
		WO 2007002222 A2	04-01-2007
WO 2005003294 A2	13-01-2005	AU 2004253857 A1	13-01-2005
		BR PI0411475 A	25-07-2006
		CA 2527877 A1	13-01-2005
		CN 102618605 A	01-08-2012
		EP 1636340 A2	22-03-2006
		EP 2378288 A1	19-10-2011
		EP 2392923 A1	07-12-2011
		EP 2410331 A1	25-01-2012
		JP 2007536899 A	20-12-2007
		JP 2013129666 A	04-07-2013
		MX PA05013833 A	17-05-2006
		US 2004265952 A1	30-12-2004
		US 2006246509 A1	02-11-2006
		US 2012004183 A1	05-01-2012
		WO 2005003294 A2	13-01-2005
WO 2012166559 A1	06-12-2012	AU 2012262559 A1	09-05-2013
		WO 2012166559 A1	06-12-2012

OnCusp
Ex. 1038

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 4 月 24 日(24.04.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/061277 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/48* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/006178

(22) 国際出願日: 2013 年 10 月 17 日(17.10.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-231579 2012 年 10 月 19 日(19.10.2012) JP

(71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 内藤 博之(NAITO, Hiroyuki); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 中田 隆(NAKADA, Takashi); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 吉田 昌生(YOSHIDA, Masao); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 蘆田 真二(ASHIDA, Shinji); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 益田 剛(MASUDA, Takeshi); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 宮崎 秀樹(MIYAZAKI, Hideki); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 粕谷 裕司(KASUYA, Yuji); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 阿部 有生(ABE, Yuki); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 扇谷 祐輔(OGITANI, Yusuke); 〒1408710 東京都品川区広町１丁目２番５８号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

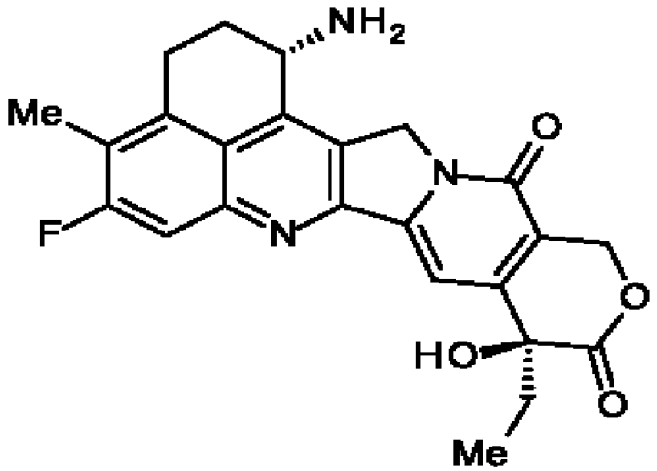
(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) **Title**: ANTIBODY-DRUG CONJUGATE PRODUCED BY BINDING THROUGH LINKER HAVING HYDROPHILIC STRUCTURE

(54) 発明の名称 : 親水性構造を含むリンカーで結合させた抗体－薬物コンジュゲート



(I)

(57) **Abstract**: Provided is an antibody-drug conjugate which can be used as an anti-tumor agent having an excellent anti-tumor effect and high safety, said conjugate being characterized in that an anti-tumor compound represented by formula (1) is bound to an antibody through a linker having a structure represented by the formula: -L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c- or the formula: -L^1-L^2-L^P- (wherein the antibody is bound at the terminal of L^1, the anti-tumor compound is bound at the terminal of L^c or L^P, and a hydrophilic structure is contained in at least one selected from L^1, L^2 and L^P).

(57) 要約: 抗腫瘍効果と安全性面に優れる抗腫瘍薬として、次式（Ｉ）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-又は-L^1-L^2-L^P-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（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又はL^Pの末端において結合し、L^1、L^2及びL^Pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水性構造を含む）を提供する。

WO 2014/061277 A1

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) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

親水性構造を含むリンカーで結合させた抗体－薬物コンジュゲート

技術分野

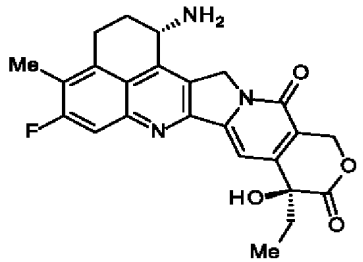
[0001]　本発明は、腫瘍細胞を標的にできる抗体と抗腫瘍性化合物とを親水性構造を有するリンカー構造部分を介して結合させた、抗腫瘍薬として有用な抗体－薬物コンジュゲートに関する。

背景技術

[0002]　癌細胞表面に発現し、かつ細胞に内在化できる抗原に結合する抗体に、細胞毒性のある薬物を結合させた抗体－薬物コンジュゲート（Antibody-Drug Conjugate；ADC）は、癌細胞に選択的に薬物を送達できることによって、癌細胞内に薬物を蓄積させ、癌細胞を死滅させることが期待できる（非特許文献１～３参照）。ADCとして例えば、抗CD33抗体にカリチアマイシンを結合させたMylotarg（ゲムツズマブオゾガマイシン）は急性骨髄性白血病の治療薬として認可されている。また、抗CD30抗体にオーリスタチンＥを結合させたAdcetris（ブレンツキシマブベドティン）はホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として最近認可された（非特許文献４参照）。これまでに認可されたADCに含有される薬物は、DNA、又はチューブリンを標的としている。

[0003]　抗腫瘍性の低分子化合物としてトポイソメラーゼＩを阻害して抗腫瘍作用を発現する化合物であるカンプトテシン誘導体が知られている。その中で下式

[0004]［化1］



[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）。しかしながら、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わらず、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の報告がある一方で、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に関連する化合物として、-GGFG-スペーサーとエキサテカンの間に-$NH(CH_2)_4C(=O)$-を挿入し、-GGFG-$NH(CH_2)_4C(=O)$-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 various 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させることによって、

抗腫瘍性を有する抗体であればその抗腫瘍効果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が当該化合物の単体の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た。

特に、リンカーのペプチド部分においてグリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に結合させたリンカー構造；

リンカーのペプチド部分においてグリシン又はグリシルグリシンをＣ末端に結合させたリンカー構造；

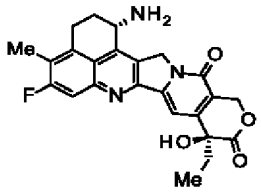
親水性構造を有するリンカー要素を、リンカー中のペプチド部分と抗体との間に結合させたリンカー構造；

を有するリンカーを構築し、この様な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得ることに成功した。そしてこれらの抗体－薬物コンジュゲートが抗腫瘍効果を発揮する薬物成分の遊離に優れており、その結果、本発明の抗体－薬物コンジュゲート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] すなわち本発明は、

［１］ 次式：

[0012] [化2]



[0013] で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

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

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。

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又はL^P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)-、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-、-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^5$-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、n^5は、１から８の整数を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2$-CH_2-O$)n^6$-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、-S-$(CH_2)n^8$-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、n^8は、１から６の整数を示し、

L^Pは、３から８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-$(CH_2)n^9$-、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^9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、-$(CH_2)n^a$-COOH、又は-$(CH_2)n^b$-OHを示すが、n^aは、整数の１から４を示し、n^bは、１から６の整数を示し、

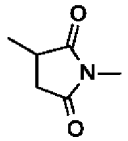
L^bは、-CR^2($-R^3$)-、-O-、-NR^4-、又は単結合を示し、

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、-$(CH_2)n^c$-NH_2、-$(CH_2)n^d$-COOH、又は-$(CH_2)n^e$-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^cは、０から６の整数を示し、n^dは、整数の１から４を示し、n^eは、整数の１から４を示すが、n^c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：

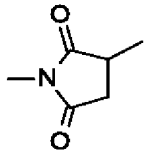
[0014] [化3]



[0015] 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：

[0016] [化4]



[0017] 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。

ただし、リンカーのL^1、L^2、及びL^Pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水性構造を含む構造であり、

この親水性構造とは、

リンカーL^Pにおいては、

L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカーL^1においては、L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカーL^2においては、L^2が、-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である場合である。

[0018] さらに本願発明は以下の各々にも関するものである。

［２］ L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、-(Succinimid-3-yl-N

)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-、又は-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-、であり、

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が、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、又は単結合であり、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、

L^Pが、３から８個のアミノ酸で構成されるペプチド残基であり、

L^a及びL^bが、単結合であり、

L^cが、-C(=O)である［１］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３］　L^1、L^2、又はL^Pのいずれか一箇所が親水性構造を含むリンカーである［１］又は［２］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［４］　親水性構造を含むリンカーがL^Pである［３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［５］　L^Pが、Ｎ末端にグリシン以外の親水性アミノ酸を有するペプチド残基である［４］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［６］　グリシン以外の親水性アミノ酸が、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、チロシン、又はアルギニンである［５］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７］　L^PにおけるＮ末端のグリシン以外の親水性アミノ酸が、グルタミン酸、アスパラギン酸、又はリシンである［５］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［８］　L^PにおけるＮ末端の親水性アミノ酸に続くペプチド残基が、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［６］又は［７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［９］　L^PにおけるＮ末端の親水性アミノ酸に続くペプチド残基が、３又は４のアミノ酸からなるペプチド残基である［８］に記載の抗体－薬物コンジ

ュゲート。

［１０］　L^PにおけるＮ末端の親水性アミノ酸に続くペプチド残基が、GGF又はGGFGである［９］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１１］　L^Pが、DGGF、KGGF、EGGF、DGGFG、KGGFG、又はEGGFGである［５］から［１０］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１２］　L^Pが、DGGFG、KGGFG、又はEGGFGである［５］から［１０］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１３］　リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$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］　L^cが、-C(=O)-である［１３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１５］　L^1が-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-であり、n^2が２から５の整数であり、L^2が単結合である［１４］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１６］　n^2が５である［１５］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１７］　n^1が１から３である［１５］又は［１６］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１８］　リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$部分の構造が、

$-NH-CH_2-C(=O)-$、

$-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$、

$-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は

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

である［５］から［１７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１９］　リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$部分の構造が、

$-NH-CH_2-C(=O)-$、

$-NH-(CH_2)_2-C(=O)-$、又は

$-NH-(CH_2)_3-C(=O)-$、

である［５］から［１７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２０］　リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造のリンカーである［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。

［２１］　L^1が$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$であり、$n^2$が２から５の整数であり、$L^2$が単結合である［２０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２２］　n^2が５である［２１］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２３］　L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である［４］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２４］　ペプチド残基が４から８のアミノ酸で構成されるリンカーである［２３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２５］　Ｃ末端の、グリシンからなるオリゴペプチドが、２または３のグリシンからなるオリゴペプチドである［２３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２６］　ペプチドリンカーがGGFGG、又はGGFGGGである［２３］から［２５］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２７］　L^1が$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$であり、$n^2$が２から５の整数である［２３］から［２６］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２８］　n^2が５である［２７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２９］　L^1が$-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-$である［３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３０］　n^3が２または３である［２９］に記載の抗体－薬物コンジュゲー

ト。

［３１］　L^2が-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である［３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３２］　n^7が２から４である［３１］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３３］　リンカーが、-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である［２９］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。

［３４］　L^cが、-C(=O)-である［３３］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３５］　n^1が１から３である［２９］から［３４］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３６］　L^Pが、GGFGである［２９］から［３５］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３７］　リンカーの-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-部分の構造が、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-(CH_2)$_2$-C(=O)-、

-NH-(CH_2)$_3$-C(=O)-、

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、又は

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

である［２９］から［３６］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３８］　リンカーの-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-部分の構造が、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-(CH_2)$_2$-C(=O)-、又は

-NH-(CH_2)$_3$-C(=O)-、

である［２９］から［３６］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３９］　抗体とL¹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アミド結合
である［１］から［３８］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
［４０］　抗体とL¹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、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
である［１］から［３８］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
［４１］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-

DX)、

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

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

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

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

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

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

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

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2C

H_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

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

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

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

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

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

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

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

［４２］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

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

［４３］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

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

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

［４４］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-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)-DGGFG-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)-KGGF-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)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

［４５］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-DGGF-(NH-DX)、

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

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

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

［４６］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-DGGFG-(NH-DX)、

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

［４７］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-DGGFG-(NH-DX)。

［４８］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

［４９］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

［５０］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)。

［５１］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

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

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

［５２］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

［５３］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

［５４］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

［５５］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(CH_2CH_2-COOH)-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(CH_2CH_2-COOH)-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［５６］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

［５７］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

。

［５８］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

［５９］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)。

［６０］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［６１］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(

=O)-GGFG-(NH-DX)、

［６２］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［６３］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次の構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)。

［６４］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［４０］又は［４１］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)-GGFGG-(NH-DX)、

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

［６５］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)。

［６６］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、

次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

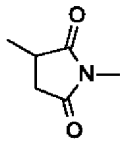
［６７］　抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物－リンカー構造部分が、次のいずれかの構造である［１］、［２］、［３９］又は［４０］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)。

[0019]　ここで、［４１］から［６７］において、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

[0020] [化5]

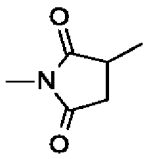


[0021] で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[0022] [化6]

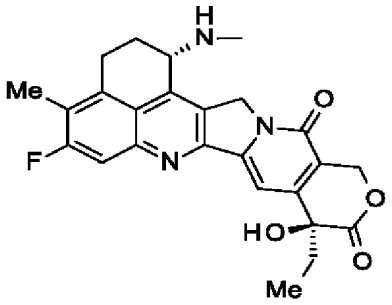


[0023] で示される構造であり、このものの３位でL^2と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(NH-DX)は、次式

[0024]

［化7］



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。

［0025］［６８］　１抗体あたりの抗腫瘍性化合物の平均結合数が、１から１０個の範囲である［１］から［６７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［６９］　１抗体あたりの抗腫瘍性化合物の平均結合数が、１から８個の範囲である［１］から［６７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７０］　１抗体あたりの抗腫瘍性化合物の平均結合数が、３から８個の範囲である［１］から［６７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７１］　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［７０］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７２］　標的細胞が腫瘍細胞である［７１］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Ｓ

ＬＣ４４Ａ４抗体、又は抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体である［１］から[７２]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［１］から[７２]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［１］から[７２]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７６］　［１］から［７５］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、又はそれらの水和物を含有する医薬。

［７７］　［１］から［７５］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。

［７８］　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［７７］に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

［７９］　［１］から［７５］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。

［８０］　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［７９］に記載の医薬組成物。

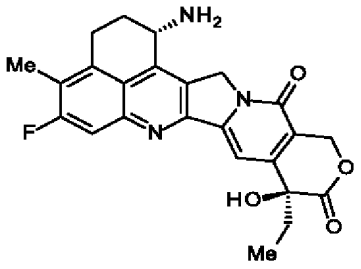
［８１］　［１］から［７５］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

［８２］　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［８１］に記載の治療方法。

［８３］　次式

[0026]

[化8]



[0027] で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

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

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又はL^P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、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$、$-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-$、又は$-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-$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、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-$、$-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-$又は単結合を示し、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、

L^Pは、３から８個のアミノ酸で構成される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、

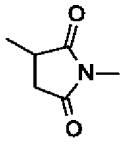
ここで、R^2及びR^3は、水素原子を示し、

L^cは、$-C(=O)-$を示し、

$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

[0028]

［化9］



[0029] 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が、

ただし、リンカーのL^1、L^2、及びL^Pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水性構造を含む構造であり、

この親水性構造とは、

リンカーL^Pにおいては、

L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

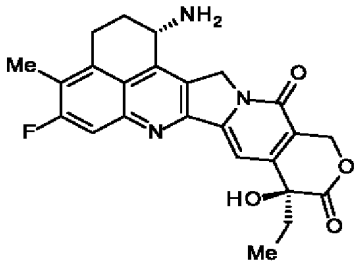
L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカーL^1においては、L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカーL^2においては、L^2が、-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である場合である。

［８４］　次式

[0030] ［化10］



[0031] で示される抗腫瘍性化合物と抗体とを次式：

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

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又はL^P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、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$又は$-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-$を示すが、これらは抗体のヒンジ部のジスルフィド結合の部分でチオエーテル結合で結合し、

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、

L^2は、$-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-$又は単結合を示し、

ここで、n^7は、１から４の整数を示し、

L^Pは、３から８個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

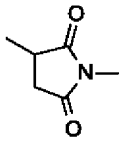
L^aは、単結合を示し、

L^bは、単結合を示し、

L^cは$-C(=O)-$を示し、

ここで、$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

[0032] [化11]



[0033] 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が、

ただし、リンカーのL^1、L^2、及びL^Pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水性構造を含む構造であり、

この親水性構造とは、

リンカーL^Pにおいては、

L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカーL¹においては、L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカーL²においては、L^2が、-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である場合である。

［８５］　次式のいずれかで示される薬物－リンカー中間体化合物：

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

Q-L^{1a}-$(CH_2)n^Q$-C(=O)-L^{2a}-L^P-(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、

L^{1a}は-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-又は単結合を示し，

n^Qは、整数の０から８を示し、

L^{2a}は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、

L^Pは、３から８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-$(CH_2)n^9$-、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^9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、-$(CH_2)n^a$-COOH、又は-$(CH_2)n^b$-OHを示すが、n^aは、整数の１から４を示し、n^bは、１から６の整数を示し、

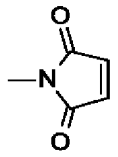
L^bは、-CR^2(-R^3)-、-O-、-NR^4-、又は単結合を示し、

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、$-(CH_2)n^c-NH_2$、$-(CH_2)n^d-COOH$、又は$-(CH_2)n^e-OH$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^cは、０から６の整数を示し、n^dは、整数の１から４を示し、n^eは、整数の１から４を示すが、n^c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$-C(=O)-$を示すが、

ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

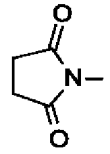
[0034] [化12]



[0035] 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

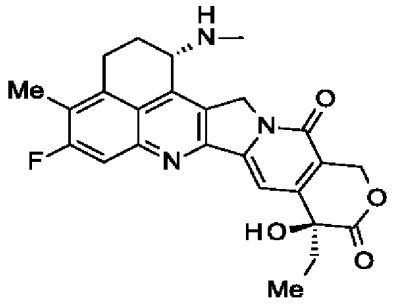
[0036] [化13]



[0037] 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

[0038] [化14]



[0039] 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。

ただし、リンカーの$L^{1a}-(CH_2)n^Q-C(=O)-$、L^2、及びL^Pのいずれか１箇所又は

２箇所以上は親水性構造を含む構造であり、

この親水性構造とは、

リンカーL^{P}においては、

L^{P}が、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

L^{P}が、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカー-L^{1a}-(CH$_2$)n^{Q}-C(=O)-においては、L^{1a}-(CH$_2$)n^{Q}-C(=O)-が、-CH[-(CH$_2$)n^{3}-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカー-L^{2a}においては、L^{2a}が、-N[-(CH$_2$CH$_2$-O)n^{7}-CH$_2$CH$_2$-OH]-CH$_2$-C(=O)-である場合である。

［８６］　次式のいずれかで示される薬物－リンカー中間体化合物：

Q-L^{1a}-(CH$_2$)n^{Q}-C(=O)-L^{2a}-L^{P}-NH-(CH$_2$)n^{1}-L^{a}-L^{b}-L^{c}-(NH-DX)、または

Q-L^{1a}-(CH$_2$)n^{Q}-C(=O)-L^{2a}-L^{P}-(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、

L^{1a}は-CH[-(CH$_2$)n^{3}-COOH]-又は単結合を示し，

n^{Q}は、整数のＯから８を示し、

L^{2a}は、-NH-(CH$_2$-CH$_2$-O)n^{6}-CH$_2$-CH$_2$-C(=O)-、-N[-(CH$_2$CH$_2$-O)n^{7}-CH$_2$CH$_2$-OH]-CH$_2$-C(=O)-、又は単結合を示し、

　ここで、n^{6}は、Ｏから６の整数を示し、n^{7}は、１から４の整数を示し、

L^{P}は、３から８個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

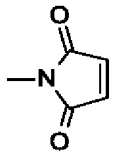
n^{1}は、Ｏから６の整数を示し、

L^{a}、L^{b}は、単結合を示し、

L^{c}は、-C(=O)-を示すが、

ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

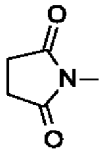
[0040] [化15]



[0041] 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

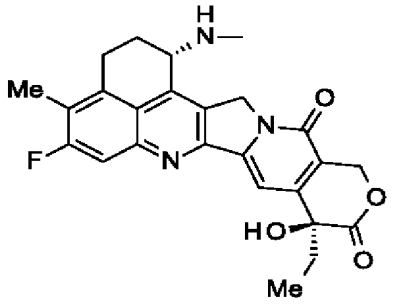
[0042] [化16]



[0043] 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

[0044] [化17]



[0045] 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。

[0046] ［８７］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

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

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

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

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

、

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

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

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

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

、

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

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

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

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

、

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

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

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

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

。

［８８］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

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

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

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

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

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

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

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

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

［８９］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［９０］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

［９１］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-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)-DGGF-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)-DGGF-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)-DGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-DGGFG-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)-DGGFG-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)-DGGFG-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)-DGGFG-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)-KGGFG-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)-KGGFG-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)-KGGFG-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)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［９２］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-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)-DGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-DGGFG-NH-CH$_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-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)-KGGFG-NH-CH$_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH$_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)。

［９３］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［９４］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

［９５］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

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

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

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

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

［９６］　次のいずれかの［８６］に記載の化合物：

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

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

［９７］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

［９８］　次のいずれかの［８６］に記載の化合物：

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)。

［９９］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

［１００］　次のいずれかの［８６］に記載の化合物：

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)。

［１０１］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

HS-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

［１０２］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

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

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

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

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

H_2-C(=O)-(NH-DX)。

［１０３］　次式の構造の［８６］に記載の化合物：

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

［１０４］　次群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

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

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

［１０５］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

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

(maleimid-N-yl)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

［１０６］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

X-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

［１０７］　次の群から選ばれる［８６］に記載の化合物：

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

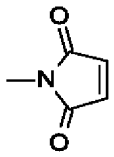
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

。

[0047]　ここで、上記の［８７］から［１０７］において、(maleimid-N-yl)-は、次式

[0048] [化18]

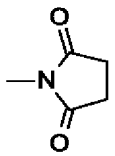


[0049] で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

Ｘはハロゲン原子を意味し、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

[0050] [化19]

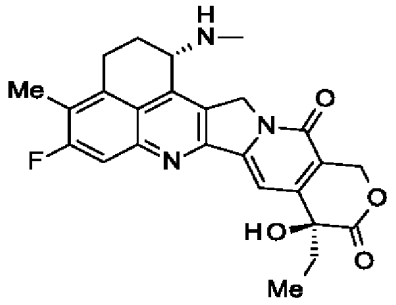


で示される、窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[0051]

[化20]



[0052]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。

[0053]［１０８］　リンカーを介して抗腫瘍性化合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のいずれかで示される構造のリンカー。

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

$-L^1-L^2-L^P-$

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又はL^P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、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$、$-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-$、$-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-$、$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$、又は$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-$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、n^5は、１から８の整数を示し、

L^2は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-$、$-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-$、$-S-(CH_2)n^8-C(=O)-$、又は単結合を示し、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、n^8は、１から６の整数を示し、

L^Pは、３から８個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^aは、$-C(=O)-NH-$、$-NR^1-(CH_2)n^9-$、$-O-$、又は単結合を示し、

ここで、n^9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、$-(CH_2)n^a-COOH$、又は$-(CH_2)n^b-OH$を示すが、n^aは、整数の１から４を示し、n^bは、１から６の整数を示し、

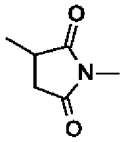
L^bは、$-CR^2(-R^3)-$、$-O-$、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

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、$-(CH_2)n^c-NH_2$、$-(CH_2)n^d-COOH$、又は$-(CH_2)n^e-OH$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^cは、０から６の整数を示し、n^dは、整数の１から４を示し、n^eは、整数の１から４を示すが、n^c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：

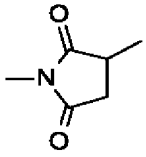
[0054] [化21]



[0055] 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：

[0056] [化22]



[0057] 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。

ただし、リンカーのL^1、L^2、及びL^Pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水

性構造を含む構造であり、この親水性構造とは、

リンカーL^{P}においては、

L^{P}が、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

L^{P}が、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカーL^{1}においては、L^{1}が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH$_2$)n^{3}-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカーL^{2}においては、L^{2}が、-N[-(CH$_2$CH$_2$-O)n^{7}-CH$_2$CH$_2$-OH]-CH$_2$-C(=O)-である場合である。

［１０９］　次の群から選ばれる［１０８］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$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH$_2$CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH$_2$CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH$_2$CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH$_2$CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-CH$_2$-C(=O)-NH-CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH$_2$CH$_2$CH$_2$-C(=O)-、

-CH$_2$-C(=O)-NH-CH$_2$CH$_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH$_2$-O-CH$_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

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

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

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

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

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

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

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

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

［１１０］　次の群から選ばれる［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

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

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

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

［１１１］　次のいずれかの［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

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

［１１２］　次の群から選ばれる［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

［１１３］　次のいずれかの［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

［１１４］　次の群から選ばれる［１０８］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：

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-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)-DGGFG-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)-KGGF-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)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

［１１５］　次のいずれかの［１０８］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：

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

［１１６］　次の群から選ばれる［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-、

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

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

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-、

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

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

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

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

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

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

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

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

［１１７］　次の群から選ばれる［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-、

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

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

［１１８］　次のいずれかの［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-、

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

［１１９］　次の構造の［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-。

［１２０］　次のいずれかの［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-。

［１２１］　次の構造の［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-。

［１２２］　次のいずれかの［１０８］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：

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

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

［１２３］　次の構造の［１０８］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：

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

［１２４］　次の群から選ばれる［１０８］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(CH_2CH_2-COOH)-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、

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

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

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

［１２５］　次の群から選ばれる［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

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

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

［１２６］　次の群から選ばれる［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-。

［１２７］　次の群から選ばれる［１０８］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：

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

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

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

［１２８］　次の構造の［１０８］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(CH_2CH_2-COOH)-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-。

［１２９］　次の構造の［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-。

［１３０］　次の構造の［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-。

［１３１］　次の構造の［１０８］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：

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2

-C(=O)-GGFG-。

［１３２］　次のいずれかの［１０８］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)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGG-、

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

［１３３］　次のいずれかの［１０８］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：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGGG-。

［１３４］　次のいずれかの［１０８］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：

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

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

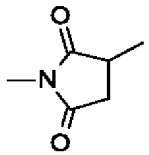
［１３５］　次のいずれかの［１０８］に記載のリンカー、ただし左端が抗体との結合部位であり、右端が抗腫瘍性化合物との結合部位である：

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

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

[0058]　ここで、上記の［１０９］から［１３５］において、-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[0059] [化23]

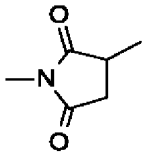


[0060] で示される構造であり、このものの３位でL^2と結合し、１位の窒素原子上でこの構造を含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

-(N-ly-3-diminiccuS)-は次式：

[0061]

［化24］



［0062］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す。

［１３６］　次式のいずれかで示される化合物：

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

Q-L^{1a}-$(CH_2)n^Q$-C(=O)-L^{2a}-L^P-(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

によって薬物ー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ー薬物コンジュゲートの製造方法。

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、

L^{1a}は、-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-又は単結合を示し、

n^Qは、整数の０から８を示し、

L^{2a}は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、

L^Pは、３から８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-$(CH_2)n^9$-、-O-、又は単結合を示し、

ここで、n^9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、$-(CH_2)n^a-COOH$、又は$-(CH_2)n^b-OH$を示すが、n^aは、整数の１から４を示し、n^bは、１から６の整数を示し、

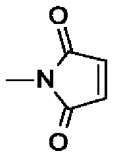
L^bは、$-CR^2(-R^3)-$、$-O-$、$-NR^4-$、又は単結合を示し、

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、$-(CH_2)n^c-NH_2$、$-(CH_2)n^d-COOH$、又は$-(CH_2)n^e-OH$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^cは、０から６の整数を示し、n^dは、整数の１から４を示し、n^eは、整数の１から４を示すが、n^c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$-C(=O)-$を示すが、

ここで，(maleimid-N-yl)-は、次式

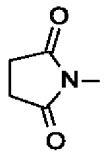
[0063] [化25]



[0064] 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

[0065] [化26]

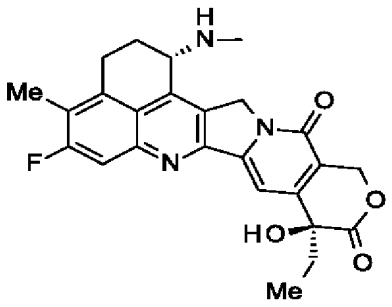


[0066] で示される窒素原子が結合部位である基であり、

-(NH-DX)は、次式

[0067]

［化27］



［0068］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が、ただし、リンカーのL^{1a}-$(CH_2)n^Q$-C(=O)-、L^2、及びL^Pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水性構造を含む構造であり、

この親水性構造とは、

リンカーL^Pにおいては、

L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって薬物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカーL^{1a}-$(CH_2)n^Q$-C(=O)-においては、L^{1a}-$(CH_2)n^Q$-C(=O)-が、-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカーL^{2a}においては、L^{2a}が、-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である場合である。

［１３７］　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}-$(CH_2)n^Q$-C(=O)-Q^2

［式中、Q^1は、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-、(3-Sulfo-pyrrol

idine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-、R^Q-O-C(=N)-、又はO=C=N-を示し、

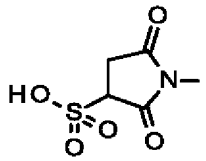
L^{1a}は、-cyc.Hex(1,4)-CH_2-、炭素数１から１０のアルキレン基、フェニレン基、-$(CH_2)n^4$-C(=O)-、-$(CH_2)n^{4a}$-NH-C(=O)-$(CH_2)n^{4b}$-、又は-$(CH_2)n^{4a}$-NH-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-を示し、

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の整数を示すが、

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

[0069] [化28]



[0070] 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、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［１３６］に記載の抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

［１３８］　次式のいずれかで示される化合物：

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

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

が、［８７］から［１０７］のいずれか一項に記載されている化合物である［１３６］又は［１３７］に記載の抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

［１３９］　［１３６］から［１３８］のいずれか一項に記載の製造方法によって製造された抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

発明の効果

[0071] 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を達成することができる。

図面の簡単な説明

[0072] [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、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、抗体－薬物コンジュゲート（１）、（２）、（１８）及び（１９）の１０ｍｇ／ｋｇ投与時のマウス移植ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞への効果を示す。白ひし形線は無処置の腫瘍、黒ひし形線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１）、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（２）、黒三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１８）、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）の効果を示す。

[図18]図１８は、抗体－薬物コンジュゲート（２）１ｍｇ、３ｍｇ／ｋｇ、抗体－薬物コンジュゲート（１９）１ｍｇ、３ｍｇ／ｋｇ投与時のマウス移植ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞への効果を示す。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）１ｍｇ／ｋｇ投与時、白四角線は３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒丸線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）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、Ｍ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、抗体－薬物コンジュゲート（１）、（２）、（１８）、（１９）の１０ｍｇ／ｋｇ投与時のマウス移植ヒト非小細胞肺癌株Ｃａｌｕ－６細胞への効果を示す。白ひし形線は無処置の腫瘍、黒ひし形線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１）、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（２）、黒三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１８）、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）の効果を示す。

[図20]図２０は、抗体－薬物コンジュゲート（３）、（２０）、（３０）（３，１０ｍｇ／ｋｇ）投与時のマウス移植ヒトメラノーマ株Ａ３７５細胞へ

の効果を示す。白ひし形線は無処置の腫瘍、黒四角点線は抗体－薬物コンジュゲート（３）３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒四角実線は１０ｍｇ／ｋｇ投与時、黒三角点線は抗体－薬物コンジュゲート（２０）３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒三角実線は１０ｍｇ／ｋｇ投与時、黒丸点線は抗体－薬物コンジュゲート（３０）３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒丸実線は１０ｍｇ／ｋｇ投与時の効果を示す。

発明を実施するための形態

[0073] 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。

[0074] ［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としては、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。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傷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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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１５０　ｍＭ　ＮａＣｌ、１５　ｍＭ　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。

[0078] 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－Ｈ３　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、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３１６番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に相当する。

[0079] 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。

[0080] （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，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。

[0081] （２）　抗Ｂ７－Ｈ３モノクローナル抗体の製造

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。

[0082] （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。

[0083] （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、抗原である膜蛋白質画分、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．Ｉｍｍｕ

ｎｏｌ．（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。

[0084] （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 Ｍｏ

ｄｉｆｉｅｄ 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。

[0085] （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。

[0086] （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。

[0087] （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。

[0088] 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。

[0089] （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。

OnCusp
Ex. 1038

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 Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ 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。

[0090] （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プ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。

［0091］（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。

[0092] 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、１

OnCusp
Ex. 1038

４、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。

[0093] 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；及び非帯電極性ファミリー＝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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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．Ａｃａｄ．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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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末端のリシ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。

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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。

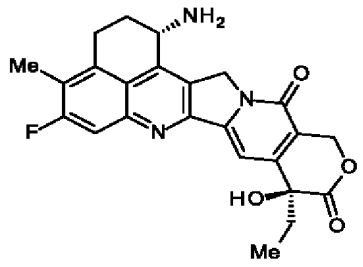
[0109] ［抗腫瘍性化合物］

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。

[0110] 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－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：）

[0111]

［化29］



［0112］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－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－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、薬物平均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、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。

[0113] ［リンカー構造］

１．親水性構造を含むリンカー

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、リンカー構造内において親水性構造部分を形成させたリンカー構造となっていることが特徴である。この親水性構造部分は、リンカーのL^P部分、L^1部分、又はL^2部分に存在し、複数が親水性構造となっていてもよい。この親水性構造とは、次の場合をいう。

リンカーL^Pにおいては次の２の態様のいずれか、すなわち、

L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合、又は、

L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって薬物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合、

であり、

リンカーL^1においては、L^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-の態様となる場合であり、

リンカーL^2においては、L^2が、-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-の態様となる場合である。

[0114] 以下に本発明のリンカーについて述べるが、本発明のリンカーは、次式：

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

のいずれかの構造を有する。抗体は、L^1の末端で、L^2が結合するのとは反対側の末端、で結合する。抗腫瘍性薬物はL^cの末端で、L^bが結合するのとは反対側の末端で結合するか、又はL^Pの末端、L^2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。

[0115] ２．L^Pにおける親水性構造

各リンカーにおける親水性構造について述べる。リンカーL^Pにおいては親水性構造として２個の態様が存在する。そのひとつは、ペプチド残基L^Pが、Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチド残基となっている場合であり、かつ、Ｎ末端はグリシン以外の親水性アミノ酸となっている場合である。

[0116] このようなペプチドリンカーを構成するアミノ酸の数は、全体で３個から８個の範囲であればよい。グリシン以外の親水性アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、チロシン、又はアルギニンであればよい。これ等のうちでは、グルタミン酸、アスパラギン酸又はリシンが好ましいが、より好ましくはアスパラギン酸である。この親水性アミノ酸の数は、１又は複数でよく、好ましくは１又は２であり、より好ましくは１である。

この親水性アミノ酸に続くペプチドは、全体で２個から７個の範囲であればよく、アミノ酸３又は４で構成されるアミノ酸がより好ましい。このペプチドは、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）等から選ばれるアミノ酸からなるペプチドであればよい。またペプチドを構成するアミノ酸としては、L-又はD-アミノ酸のいずれでもよいが、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。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。ペプチドリンカーのＮ末端から２番

目以降のペプチドとしては、GGF、GGFGが好ましい。

Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドリンカーL^{P}としては、DGGF、KGGF、EGGF、DGGFG、KGGFG、又はEGGFGが好ましく、より好ましくは、DGGF、KGGF、DGGFG、又はKGGFGであり、さらに好ましくはDGGF又はDGGFGである。

[0117] L^{P}が親水性リンカーとなる別異の態様として、リンカーL^{P}が、そのＣ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって薬物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならない場合、を挙げることができる。グリシンも親水性アミノ酸として分類されるが、ペプチドリンカーにおいて親水性アミノ酸としてグリシンを採用する場合は、Ｃ末端側に複数を結合させることがよい。このようなグリシンのオリゴペプチドとしては、２個又は３以上であればよいが、好ましくはグリシンのジー又はトリーペプチドである。

L^{P}が、グリシンからなるオリゴペプチドを含有して親水性リンカーとなる場合、好ましくは、GGFGG又はGGFGGGを挙げることができる。

またL^{P}が、そのＣ末端にグリシンからなるオリゴペプチドを含んで親水性構造となる場合、L^{P}が薬物に直接に結合する構造となることもこのペプチドリンカーの特徴である。

２又は３以上のグリシンからなるオリゴペプチドをＣ末端に有して薬物に結合している場合、ペプチドリンカーL^{P}においてはこれ以外の部分のペプチド配列は、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ペプチドでよい。ただし、この場合のペプチドリンカーのＮ末端は、親水性アミノ酸として先に挙げたアスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、チロシン、又はアルギニンとなることはない。

ペプチドを構成するアミノ酸としては、L-又はD-アミノ酸のいずれでもよいが、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－メチル化されたアミノ酸等の非天然型のアミノ酸を含んでいてもよい。アミノ酸の数は４から８のアミノ酸からなるペプチドであればよく、より好ましくは４から６である。

[0118] ３．L^P

リンカーL^Pは、以下の通り、親水性構造とならない態様も存在する。すなわち、リンカーL^Pが親水性リンカーとはならない場合であっても、リンカーL^Pは３から８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ればよい。L^Pは、Ｎ末端において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-部分又は直接に抗腫瘍性化合物に結合するが、エキサテカンであれは１位のアミノ基において結合する。

親水性リンカーとはならないL^Pを構成するアミノ酸は、親水性構造のL^Pを構成する場合のアミノ酸の構成でなければ特に限定されることはない。例えば、L-又はD-アミノ酸のいずれであってもよいが、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－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。

[0119] この様な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、チロシン、ロイシン、グリシン、アラニン、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。アミノ酸の数は、３から８個でよい。

[0120] 親水性構造を構成しないリンカーL^Pの具体例として、

-GGF-

-GGFG-

-GFLG-

を挙げることができるが、これらのうちでは、-GGF-、-GGFG-を好適に使用す

ることができる。

[0121] リンカーの-NH-(CH_2)n^1-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L^PのＣ末端に結合する。

[0122] ４．L^1、L^2における親水性構造

リンカーL^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-の態様の場合、本発明でいう親水性リンカーとなる。n^3は、１から８の整数であるが、好ましくは２から４であり、より好ましくは２である。この親水性構造部分の-(CH_2)n^3-COOHにおいて、カルボキシ基部分は、水酸基又はアミノ基であってもよい。なお、リンカーL^1が-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-である場合は、リンカーL^2は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-となってn^6が０から４が好ましい。

リンカーL^2が、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-の態様の場合、本発明でいう親水性リンカーとなる。n^7は、１から４の整数であるが、好ましくは３又は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のＮ末端と結合する。

以上の親水性構造を有するリンカーの存在によって、抗腫瘍効果を発揮する薬物成分の優れた遊離を達成することができる。

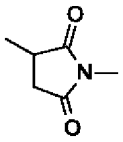
[0123] ５．L^1

リンカーL^1は、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-、-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-(CH_2)n^5-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の整数であり、n^5は、１から８の整数である。

[0124] 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

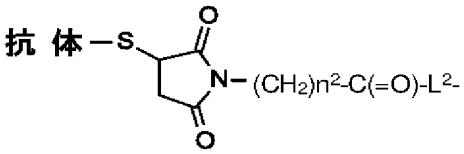
[0125]

[化30]



[0126] 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、抗体のヒンジ部のジスルフィド結合部分において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。）。

[0127] [化31]



[0128] 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。

[0129] L^1のうちの、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-は先に述べた親水性リンカーである。

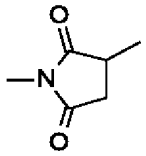
[0130] L^1のうちの-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、n^4は１から８の整数であるが、好ましくは２から６である。このリンカーは、抗体とは末端のメチレンの炭素原子上で結合するが、先と同様にチオエーテルを形成して結合する次の構造を有する（ここで「抗体－Ｓ－」は抗体由来である。）：

抗体　-S-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-L^2-。

[0131] 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：

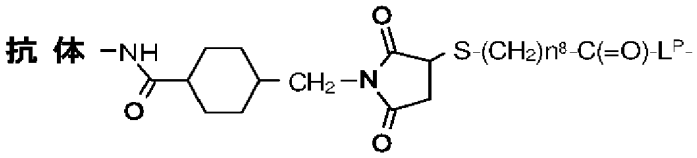
[0132]

［化32］



［0133］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L²のうちの-S-(CH₂)n⁸-C(=O)-と、その末端の硫黄原子において結合する。なお、このL²のリンカーである-S-(CH₂)n⁸-C(=O)-は、L¹リンカーのうちの-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(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)-CH₂-(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。）。

［0134］［化33］



［0135］　このアミド結合を形成する抗体のアミノ基は、抗体のリシン残基の側鎖や抗体Ｎ末端のアミノ基であればよい。なお、このリンカーはアミド結合のほか、抗体のアミノ酸が有する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。

当該リンカーの『-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い。また、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価の位置は、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。

[0136] L^1のうちの-C(=O)-$(CH_2)_{n^5}$-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、n^5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酸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)-$(CH_2)_{n^5}$-C(=O)-L^2-。

[0137] 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)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(-CH_2-COOH)-C(=O)-

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

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

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

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

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH)-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH)-C(=O)-

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-COOH)-C(=O)-

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

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

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

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

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

-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。）。

[0138] ６．L^2

リンカーL^2は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、又は-S-(CH_2)n^8-C(=O)-で示される構造のリンカーであるが、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^6は、０から６の整数であり、n^7は、１から４の整数であり、n^8は、１から６の整数である。

[0139] L^2のうちの、-NH-(CH_2CH_2O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-で示される構造のリンカーにおいて、n^6は、０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の窒素原子でL^1に結合し、反対の末端のカルボニル基でL^PのＮ末端と結合する。なお、L^1が-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-であるときは、L^2のうちの、-NH-(CH_2CH_2O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-のみが結合し、かつ、n^6は０となる。

[0140] L^2のうちの、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-(C(=O)-で示されるリンカーは先に述べた親水性リンカーである。

[0141] L^2のうちの、-S-(CH_2)n^8-C(=O)-において、n^8は、１から６の整数であるが、好ましくは２から４である。

[0142] リンカーL^2の具体例としては、

-NH-CH_2CH_2-C(=O)-

-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)-

-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-

-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-

-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-

-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-

等を挙げることができる。

[0143] さらにL^2が-S-(CH_2)n^8-C(=O)-の場合、組み合わさる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_2CH_2-C(=O)-

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

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

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

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

等を挙げることができる。

[0144] ７．L^a

リンカーのL^aは、-C(=O)-NH-、-NR^1-(CH_2)n^9-、-O-の各構造のいずれかであるか、又は単結合であるが、n^9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)n^a-COOH、又は-(CH_2)n^b-OHであり、n^aは、整数の１から４であり、n^bは、１から６の整数である。

リンカーのL^a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^aのうちの-NR^1-(CH_2)n^9-である構造部分において、n^9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、$-(CH_2)n^b-OH$で示される構造のとき、n^9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。

[0145] ８．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、$-(CH_2)n^c-NH_2$、$-(CH_2)n^d-COOH$、又は$-(CH_2)n^e-OH$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^cは、０から６の整数であり、n^dは、整数の１から４であり、n^eは、整数の０から４であるが、n^c又はn^e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$-(CH_2)n^c-NH_2$の構造であるとき、n^c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^cが０であるときはR^2及びR^3は同一にはならない。R

^{2}及びR^3が$-(CH_2)n^d-COOH$の構造であるとき、n^d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^2及びR^3が$-(CH_2)n^e-OH$の構造であるとき、n^e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^2及びR^3として好ましくは、水素原子、メチル基、エチル基、$-NH_2$、$-CH_2CH_2CH_2NH_2$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、$-CH_2COOH$、$-CH_2CH_2-COOH$、$-CH_2OH$、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、$-NH_2$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、$-CH_2COOH$、$-CH_2CH_2-COOH$、$-CH_2OH$、又は$-CH_2CH_2-OH$である。さらに好ましくは水素原子である。

R^4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^4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。

[0146] 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、

$-NH-CH_2-$

$-NH-CH(-Me)-$

$-NH-C(-Me)_2-$

$-NH-CH_2-CHMe-$

$-NH-CH(-CH_2OH)-$

$-NH-CH(-CH_2COOH)-$

$-NH-CH(-CH_2CH_2COOH)-$

$-NH-CH(-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2)-$

$-NH-CH_2CH_2-$

$-NH-CH_2-O-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2-O-$

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$

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

$-NH-CH_2CH_2NH-$

$-NH-CH_2CH_2NH-CH_2-$

$-NH-CH_2CH_2NMe-CH_2-$

-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。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] さらに好ましくは、

-NH-CH_2-

-NH-$(CH_2)_2$-

-NH-$(CH_2)_3$-

-NH-CH_2-O-CH_2-

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

である。

[0150] ９．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。

[0151] リンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、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。

[0152] 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_2-C(=O)-(NH-DX)

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-CH_2CH_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。

[0153] 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、以下に記載する構造の薬物－リンカー構造部分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。好ましい、薬物ーリンカー構造部分として以下のものを挙げることができる。

[0154] １０．L^Pが親水性構造を含む場合の具体例

薬物ーリンカー構造部分であって、L^Pが、Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチド残基となっている薬物ーリンカー構造部分は、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$又は$-L^1-L^2-L^P-(NH-DX)$のいずれかの態様で存在する。これらの薬物ーリンカー構造部分を構成する各部分のリンカーの組み合わせは以下の通りである。

[0155] リンカーL^{1}は、薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるときは、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$又は$-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-$であり、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合を介して結合させるときは、$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$又は$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-$である。

リンカーL^{2}は、リンカーL^{1}が、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$又は$-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-$であるときは単結合でよく、
リンカーL^{1}が、$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-$であるときは、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-$又は単結合から選ばれる。なお、$-S-(CH_2)n^8-C(=O)-$のリンカーは、リンカーL^{1}のうちの$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-$との組み合わせで使用される。

リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$部分は、３から７原子の鎖長である場合が好ましい。４から７原子の鎖長の場合では、より好ましくは５又は６原子の鎖長のリンカーである。リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-$部分の具体例は、先に説明したとおりであるが、$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$が特に好ましいものである。

リンカーの$-L^c-$部分は$-C(=O)-$が好ましい。

[0156] Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドであるリンカーを含む薬物ーリンカー構造部分として具体的には以下のものを挙げることができる。

[0157] 薬物－リンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるための薬物－リンカー構造部分としては、次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-EGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-EGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造のものを挙げることができる。ここで、n^2が、２から５で、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分が、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0158] より具体的には、次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)

で示されるものが好ましく、より好ましくは、n^2が、２又は５である。

[0159] さらに好ましくは、n^2が５のものであり、次式：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

H-DX)

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

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

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

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

又は次式：

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

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

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

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

で示されるものである。

[0160] これらのうちでさらに好ましくは、次式：

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

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

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

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

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

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

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

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

H-DX)

又は次式：

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

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

で示されるものである。

[0161] 薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるための、別の態様の薬物ーリンカー構造部分としては次式：

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-EGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-EGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示されるものを挙げることができる。ここで、n^4が、２から５で、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分が、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0162] より具体的には、

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-(NH-DX)

であるものが好ましい。

[0163] より好ましくは、n^4が２のものであり、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)

である。

[0164] さらに好ましくは、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

である。

[0165] また、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合を介して結合させるための薬物ーリンカー構造部分としては次式：

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-(CH_2)n^8-C(=O)-DGGF-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-(CH_2)n^8-C(=O)-KGGF-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-(CH_2)n^8-C(=O)-EGGF-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$(CH_2)n^8$-C(=O)-DGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$(CH_2)n^8$-C(=O)-KGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-$(CH_2)n^8$-C(=O)-EGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

のものを挙げることができる。ここで、n^8は１から６が好ましく、より好ましくは２である。-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0166] より具体的には、

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

又は次式：

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

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

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

)

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

)

のものがより好ましい。

[0167] これらのうちでさらに好ましくは、次式：

-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2C

H_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

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

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

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

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

又は次式：

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

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

で示されるものである。

[0168] また、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合を介して結合させるための、別の態様の薬物ーリンカー構造部分としては次式：

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-L^2-DGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-L^2-KGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-L^2-EGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-L^2-DGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-L^2-KGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-L^2-EGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造のものを挙げることができる。ここで、n^5は、６がよく、L^2は、-NH-$(CH_2CH_2O)n^6$-CH_2CH_2-C(=O)-又は単結合であるが、単結合が好ましい。なお、n^6は０、２または４、がよく、好ましくは０である。-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0169] より具体的には、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)

であるものが好ましい。

[0170] リンカーL^{P}が、C末端にグリシンからなるオリゴペプチドを有するペプチド残基である場合、薬物ーリンカー構造部分は、-L^1-L^2-L^P-(NH-DX)の如く、L^{P}が薬物に直接に結合する態様で存在する。L^{P}が、C末端にグリシンからなるオリゴペプチドを有するペプチド残基であるリンカーである場合の薬物ーリンカー構造部分を構成する各部分のリンカーの組み合わせは以下の通りである。

[0171] リンカーL¹は、薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるときは、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-又は-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-であり、薬物ーリンカー構造部分をアミド結合を介して結合させるときは、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-又は-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-から選ばれる。

リンカーL²は、リンカーL¹が、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-又は-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-であるときは-NH-$(CH_2$-CH_2-O$)n^6$-CH_2-CH_2-C(=O)-又は単結合でよく、リンカーL¹が、-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-であるときは、単結合から選ばれる。なお、-S-$(CH_2)n^8$-C(=O)-のリンカーは、リンカーL¹のうちの-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-と組み合わせて使用される。

[0172] C末端にグリシンからなるオリゴペプチドを有するペプチドであるリンカーを含む薬物ーリンカー構造部分として具体的には以下のものを挙げることができる：

[0173] 薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるための薬物ーリンカー構造部分としては次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

で示されるものを挙げることができる。ここで好ましくは、n^2が、２又は５のものである。

[0174] より好ましくは、n^2が５であり、次式：

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

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

で示されるものである。

[0175] 薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるための、別の態様の薬物ーリンカー構造部分としては次式：

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

で示されるものを挙げることができる。これらのうちでより好ましくは、n^4が、２又は５のものである。

[0176] これらのうちでより好ましくは、n^4が、２である次式：

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)$

$-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)$

で示されるものである。

[0177] また、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合又はエステル結合で結合させるための薬物ーリンカー構造部分としは、次式:

$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-(CH_2)n^8-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)$

$-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-(CH_2)n^8-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)$

で示されるものを挙げることができる。ここで、n^8は２のものが好ましい。

[0178] 具体的には、

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

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

である。

[0179] また、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合を介して結合させるための、別の態様の薬物ーリンカー構造部分としては次式：

$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-L^2-GGFGG-(NH-DX)$

$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-L^2-GGFGGG-(NH-DX)$

で示される構造のものを挙げることができる。ここで、n^5は、６がよく、L^2は、$-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-$又は単結合であるが、単結合が好ましい。なお、$n^6$としては０、２または４、がよく、好ましくは０である。

[0180] より具体的には、

$-C(=O)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)$

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

である。

[0181] １１．L^1が親水性構造を含む場合の具体例

リンカーL^1が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-であるときは、薬物－リンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合しており、薬物－リンカー構造部分は、$-L^1-L^2-L^P$-NH-$(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c$-(NH-DX)又は$-L^1-L^2-L^P$-(NH-DX)の態様で存在する。この薬物－リンカー構造部分を構成する各部分のリンカーの組み合わせは以下の通りである。

リンカーL^2は、NH-$(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2$-C(=O)-であるか又は単結合であるが、単結合が好ましい。なお、n^6としては０、２または４がよく、好ましくは０である。

リンカーL^Pはそのアミノ酸配列は、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、チロシン、ロイシン、グリシン、アラニン、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。アミノ酸の数は、３から８個でよい。具体例としては先に挙げたものであればよいが、特に好ましくはGGFGである。

リンカーの-NH-$(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c$-部分は、４から７原子の鎖長である場合が好ましい。より好ましくは５又は６原子の鎖長のリンカーである。リンカーの-NH-$(CH_2)n^1-L^a-L^b$-部分の具体例は、先に説明したとおりである。

なお、-NH-$(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c$-部分は、単結合であってもよい。

リンカーの$-L^c$-部分は-C(=O)-が好ましい。

[0182] リンカーL^1が-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である薬物－リンカー構造部分は、抗体とチオエーテル結合を介して結合しており、次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-$(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2$-C

(=O)-GGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造である。ここで、n^6は、０である。また、n^3が、２から４で、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0183] より具体的には、次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

で示されるものである。

[0184] このうち、n^3が、２のものが好ましく、次式：

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

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

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

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

又は次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-CH(CH_2CH_2-COOH)-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)のものが好ましい。

[0185] １２．L^2が親水性構造を含む場合の具体例

リンカーが-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-であるときは、薬物ーリンカー構造部分は、$-L^1-L^2-L^P$-NH-(CH_2)n^1-$L^a-L^b-L^c$-(NH-DX)又は$-L^1-L^2-L^P$-(NH-DX)の態様で存在する。この薬物ーリンカー構造部分を構成する各部分のリンカーの組み合わせは以下の通りである。

リンカーL^1は、薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるときは、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-又は-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-であり、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合を介して結合させるときは、-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-から選ばれる。

リンカーL^Pは、そ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、チロシン、ロイシン、グリシン、アラニン、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。アミノ酸の数は、３から８個でよい。具体例としては先に挙げたものであればよいが、特に好ましくはGGFGである。

リンカーの-NH-(CH_2)n^1-$L^a-L^b-L^c$-部分は、４から７原子の鎖長である場合が好ましい。より好ましくは５又は６原子の鎖長のリンカーである。リンカーの-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-部分の具体例は、先に説明したとおりである。

なお、-NH-(CH_2)n^1-$L^a-L^b-L^c$-部分は、単結合であってもよい。

リンカーの$-L^c$-部分は-C(=O)-が好ましい。

[0186] リンカーL^2が、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である薬物ーリンカー構造部分は次式：

$-L^1$-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-L^P-NH-(CH_2)n^1-$L^a-L^b-L^c$-(NH-DX)

で示されるものが好ましい。

[0187] 薬物－リンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるための薬物－リンカー構造部分としては次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2O)_{n7}$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される。ここで、n^2が、２又は５で、n^7が３又は４であり、-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0188] より具体的には、次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2O)_{n7}$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2O)_{n7}$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2O)_{n7}$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2O)_{n7}$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2O)_{n7}$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

で示されるものである。

[0189] さらに好ましくは、n^2が５で、n^7が３又は４のものであるが、さらにはn^7が３のものが好ましく、次式：

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

-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-C

H_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

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

で示されるものが好ましい。

[0190] 薬物ーリンカー構造部分を抗体にチオエーテル結合を介して結合させるための、別の態様の薬物ーリンカー構造部分としては次式：

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示されるものを挙げることができる。

ここで、n^4が、２又は５で、n^7が３又は４であり、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。

[0191] 具体的には次式：

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

で示されるものである。

[0192] これらのうちで好ましくは、n^4が２で、n^7が３又は４のものであるが、n^7は３のものがより好ましく、次式：

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

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

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

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

又は次式：

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

で示されるものである。

[0193] また、薬物ーリンカー構造部分を抗体にアミド結合を介して結合させるための薬物ーリンカー構造部分としては次式：

$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

で示される。ここで、n^5は、１から８の整数であるが、好ましくは２から６であり、n^7は３又は４であり、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$部分は、$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$であるものが好ましく、また、$L^P$が薬物に直接結合したものも好ましい。

[0194] より具体的には次式：

$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

$-C(=O)-(CH_2)n^5-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2$

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

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

-C(=O)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-N[-$(CH_2CH_2$-O$)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

で示されるものである。

[0195] さらに好ましくは、n^5が６で、n^7が３又は４のものであるが、n^7は３のものがより好ましく、次式：

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

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

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

又は次式：

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

で示されるものである。

[0196] さらに好ましくは、次式：

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

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

で示されるものである。

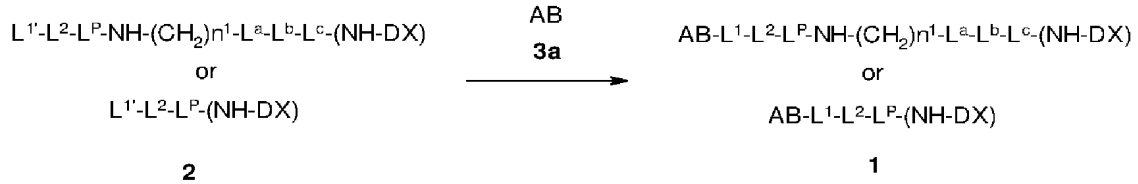
[0197] ［製造方法］

次に、本願発明の抗体－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、各反応式中に示される番号で示す。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。

[0198] １．製造方法１

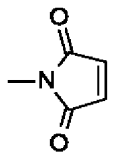
式（１）で示される抗体－薬物コンジュゲートのうち、チオエーテルを介して抗体とリンカー構造が結合しているものは例えば下記の方法によって製造することができる。

[0199] [化34]



[0200] [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）

[0201] [化35]

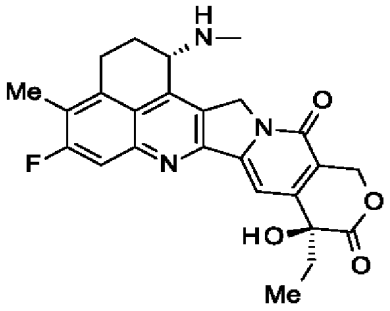


[0202] となった構造であるか（ここで、窒素原子が結合部位である。）、又は末端がハロゲンとなった構造のリンカーを示すが、Ｌ１のうちの-(Succimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-において-(Succimid-3-yl-N)-部分がマレイミジル基となった基、又はＬ１における-CH_2C(=O)NH-(CH_2)n^4-C(=O)-の末端のメチレンがハロゲ

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^4-C(=O)-基を示す。

また、-(NH-DX)は次式：

[0203] [化36]



[0204] で示される構造であり、抗腫瘍性薬物の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。なお、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。また、このことは以下の製造方法の説明の部分においても同様である。]

[0205] すなわち、後述する方法により入手しうる化合物（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り、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。

具体的には、スルフヒドリル基を有する抗体（３a）のリン酸緩衝食塩水溶液（ｐＨ７．２）中で、化合物（２）のジメチルスルホキシド溶液を加えて、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。この後、抗体薬物結合を生成させる反応において通常用いられるように、Ｎ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）を加えて、未反応の化合物（２）の反応性を失活させ、製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）は、以下の操作により濃縮、バッファー交換、精製を行い、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、及び凝集体含有率の算出を行い、抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定を行うことができる。

[0206] 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（２０００－３８００Ｇにて５－２０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２８０ ｎｍ吸光係数（１．３－１．８／ｍｇ／ｍＬ）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、メーカー規定の方法に従い、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／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、ＰＢＳ６．０／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により濃縮し、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、メーカー既定の方法に従い、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により濃縮し、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、メーカー既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）、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、メーカー既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。

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例えば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。

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \varepsilon_{D,280} C_D + \varepsilon_{A,280} C_A \quad \text{式（１）}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \varepsilon_{D,370} C_D + \varepsilon_{A,370} C_A \quad \text{式（２）}$$

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

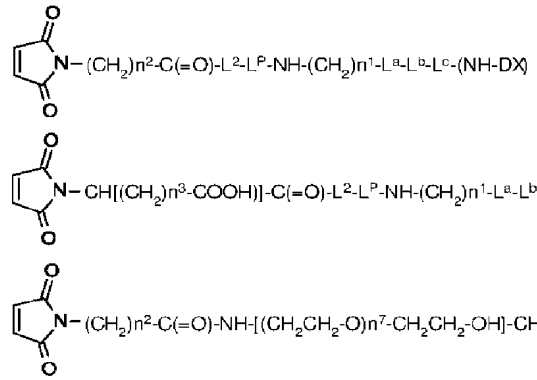
ゲート前駆体の吸光度を示し；$\varepsilon_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し；$\varepsilon_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し；$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し；$\varepsilon_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し；C_Aは抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、；C_Dは抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。

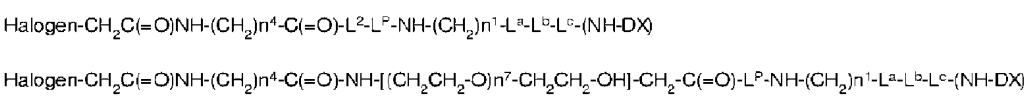
ここで、$\varepsilon_{A,280}$、$\varepsilon_{A,370}$、$\varepsilon_{D,280}$、$\varepsilon_{D,370}$は、事前の測定により既知である。抗体－薬物コンジュゲート水溶液のA_{280}及びA_{370}を測定し、これらの値を式（１）及び（２）に代入して連立方程式を解くことにより、C_A及びC_Dを求めることができる。さらにC_DをC_Aで除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求めることができる。

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。

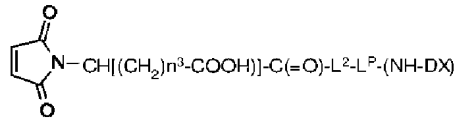
[0207]

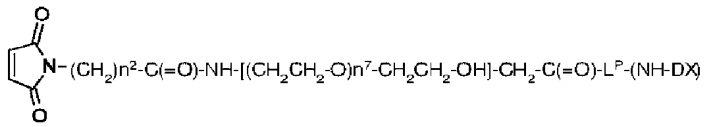
［化37］

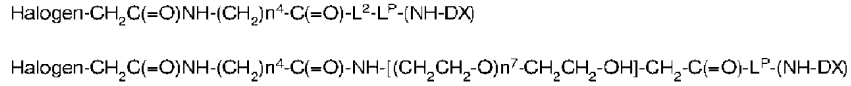


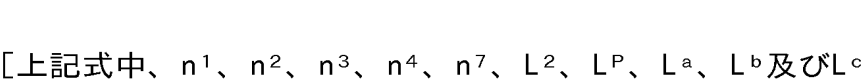












［0208］［上記式中、n^1、n^2、n^3、n^4、n^7、L^2、L^P、L^a、L^b及びL^cは、既に定義したとおりであり、L^P又はL^cは薬物との結合部位となる。］

［0209］　このような本願発明の抗体－薬物コンジュゲート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、

リンカーL^1が-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-でないときは、L^2は、-N[$(-CH_2CH_2-O)n^7$-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-であって、n^7が３又は４であるか、又は単結合であることが好ましく、

L^Pとして好ましいものは、

Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチド残基であるときは、DGGF、KGGF、EGGF、DGGFG、KGGFG、又はEGGFGであり、
グリシンからなるオリゴペプチドをＣ末端に有するペプチドリンカーであるときは、GGFGG、又はGGFGGGであり、
$-NH-(CH_2)_{n1}-L^a-L^b-L^c-$部分は、$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$の
部分構造が好ましい。

また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましいが、グリシンからなるオリゴペプチドをＣ末端に有するペプチドリンカーであるときはＣ末端は薬物に直接に結合する。

[0210] 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。］。

リンカーL^Pが、Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドリンカーである場合、製造中間体として好ましくは次式：

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-DGGF-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-KGGF-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-DGGFG-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-KGGFG-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

ここで、n^2は、２から５で、$-NH-(CH_2)_{n1}-L^a-L^b-L^c-$部分は、$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$であるものが好ましく、また、$L^P$が薬物に直接結合したものも好ましい。

[0211] より具体的には、次式：

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)_{n^2}$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)

で示されるものであるが、好ましくは、n^2が、２又は５のものである。

[0212] これらにおいて、さらに好ましくは、n^2が、５のもので次式：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

又は次式：

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

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

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

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

のものである。

[0213] リンカーL^{P}が、グリシンからなるオリゴペプチドをＣ末端に有するペプチドリンカーであるとき、製造中間体としては、次式：

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。これらのうちでは、n^2が、２から５のものが好ましい。

[0214] これらのうちでは、さらに好ましくはn^2が、５のもので次式：

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

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

で示されるものである。

[0215] リンカーL^{1}が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-であるとき製造中間体としては、次式：

(maleimid-N-yl)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-$(CH_2$-CH_2-O$)n^6$-CH_2-CH_2-C(=O)-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。ここで、n^6が、０である。n^3は、２から４で、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。L^Pは、GGFGが好ましい。

[0216] より具体的には、次式：

(maleimid-N-yl)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

(maleimid-N-yl)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

で示されるものである。

[0217] これらのうち、n^3が、２のものが好ましく、次式：

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

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

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

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

又は次式：

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

で示されるものが好ましい。

[0218] リンカーL²が-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-であるとき、製造中間体として、次式：

(maleimid-N-yl)-(CH_2)n^2-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

ここで、n^2は、２から５で、n^7は３又は４で、-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。L^Pは、GGFGが好ましい。

[0219] より具体的には、次式：

(maleimid-N-yl)-(CH_2)n^2-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-(CH_2)n^2-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-(CH_2)n^2-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

(maleimid-N-yl)-(CH_2)n^2-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

(maleimid-N-yl)-(CH_2)n^2-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

で示されるものである。

[0220] さらに好ましくは、n^2が５で、n^7が３又は４のものであるが、n^7は３のものがより好ましく、次式；

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

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

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

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

又は次式：

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

で示されるものである。

[0221] ハロゲノアセチル基を有し、Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドリンカーであるとき、製造中間体として、次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-EGGF-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-EGGFG-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

ここで、n^4は、２から５で、-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。またXとしては、臭素又はヨウ素が好ましい。

[0222] より具体的には、次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)

で示されるものがより好ましい。

[0223] さらに好ましくは、n^4が、２である次式：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

又は次式：

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

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

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

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

で示されるものである。

ここで、上記の式中の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。

[0224] ハロゲノアセチル基を有し、グリシンからなるオリゴペプチドをＣ末端に有するペプチドリンカーであるときは製造中間体として、次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

[0225] 好ましくは、n^4が、２又は５のものであるが、より好ましくは２であり、次式：

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

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

で示されるものである。

ここで、式中のＸは、臭素原子又はヨウ素原子を示す。以上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。

[0226] リンカーL²が-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-であるとき、製造中間体として、次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

ここで、n^4は、２から５で、n^7は３又は４であり、-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-部分は、-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)-であるものが好ましく、また、L^Pが薬物に直接結合したものも好ましい。L^Pは、GGFGが好ましい。

[0227] 具体的には次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

のものである。

[0228] さらに好ましくは、n^4が２で、n^7が３又は４のものであるが、n^7は３のものがより好ましく、次式；

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)n^4-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

又は次式：

X-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)

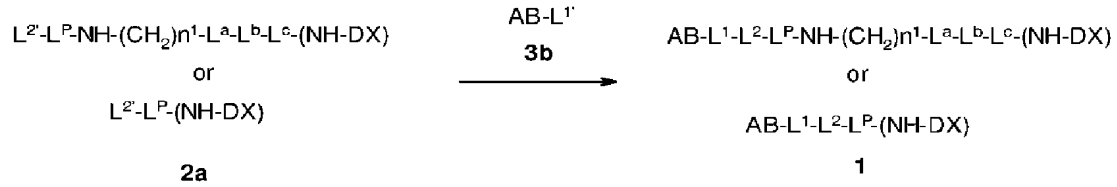
で示されるものが好ましい。

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。

[0229] ２．製造方法２

式（１）で示される抗体ー薬物コンジュゲート及びそれらの薬理上許容される塩のうち、抗体との結合がアミド基であって、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-dimiccuS)-S-$(CH_2)n^8$-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。

[0230] [化38]



[0231] [式中、AB-Ｌ１’は、抗体とリンカーＬ１が結合し、さらにＬ１の末端がＮー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-dimiccuS)-において、-(N-ly-3-dimiccuS)-がマレイミジル基に変換された構造である。Ｌ２’は末端がメルカプト基となったHS-$(CH_2)n^8$-C(=O)-基を示し、ＡＢは抗体を示す。]

[0232] すなわち、後述する方法により入手しうる化合物（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り、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抗体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、-$(CH_2)n^{4}$-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^{4a}は０から６の整数、n^{4b}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。

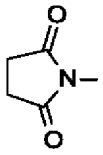
L^{1a}におけるアルキレン基としては、炭素数１から１０のものであればよい。フェニレン基としては、オルト、メタ、パラいずれのものでもよいが、パラ、またはメタのものがより好ましい。

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)-、-$(CH_2)_3$-(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。

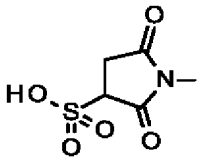
ここで、(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-は、次式

[0233] [化39]



[0234] 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

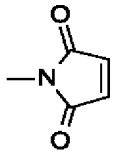
[0235] [化40]



[0236] 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

[0237] [化41]



[0238] 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上記の化合物の他には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）等を用いてもよい。

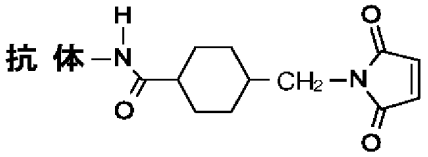
具体的には、例えば、抗体（３）に対して、２乃至６当量のＳＭＣＣを、ｐＨ６乃至７のリン酸緩衝液中で、室温かつ１乃至６時間反応させることで、ＳＭＣＣの活性エステルが抗体と反応しマレイミジル基を有する抗体（３ｂ）を得ることが出来る。得られた抗体（３ｂ）は下記の共通操作Ｄ－２によって精製し、次の化合物（２）との反応に用いることができる。

抗体のアミノ基、ヒドロキシル基は、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。

製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）は濃縮、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、及び凝集体含有率の算出による抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定は製造方法１で述べたように行えばよい。

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。）。

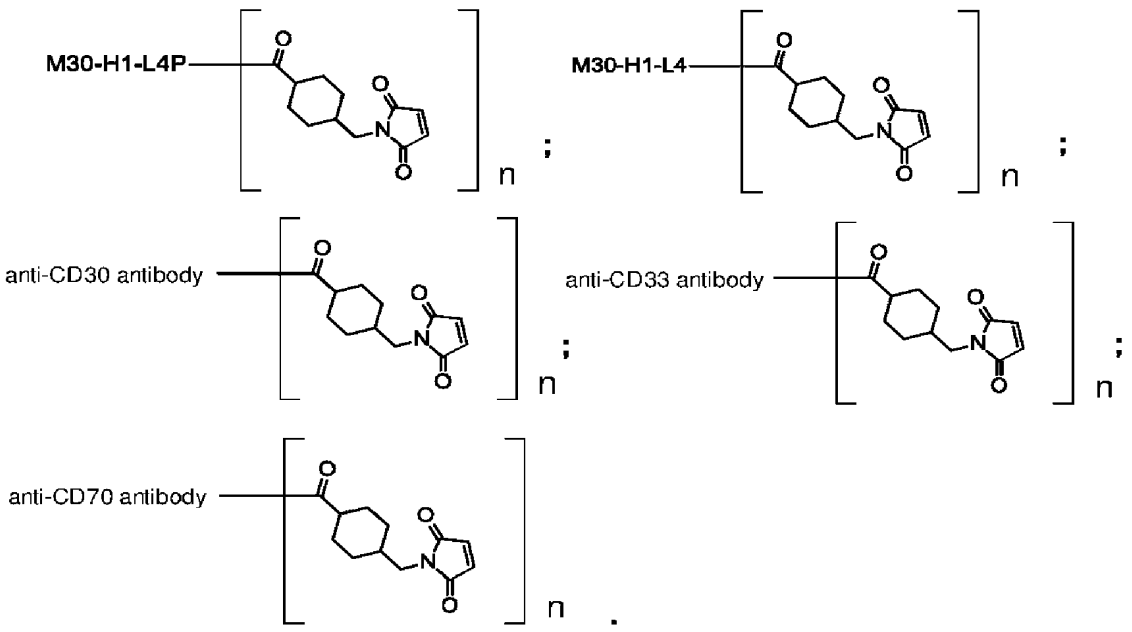
[0239] [化42]



[0240] 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７である。）。

[0241]

[化43]



[0242] さらに末端がメルカプト基となった本願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。

Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドリンカーであるものとして製造中間体として、次式：

$HS-(CH_2)n^8-C(=O)-DGGF-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

$HS-(CH_2)n^8-C(=O)-KGGF-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

$HS-(CH_2)n^8-C(=O)-DGGFG-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

$HS-(CH_2)n^8-C(=O)-KGGFG-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-(NH-DX)$

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

ここで、n^8は、２から５で、$-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$部分は、$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$であるものが好ましく、また、$L^P$が薬物に直接結合したものも好ましい。

[0243] より具体的には、n^8が、２のものが好ましく、次式：

$HS-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

又は次式：

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

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

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

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

のものである。

[0244] グリシンからなるオリゴペプチドをＣ末端に有するペプチドリンカーであるとき、製造中間体として、次式：

HS-$(CH_2)n^8$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)

HS-$(CH_2)n^8$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

で示される構造の化合物を好適に使用することができる。

ここでn^8が、２又は５のものが好ましい。

[0245] より好ましくは、n^8が、２のものであり、次式：

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

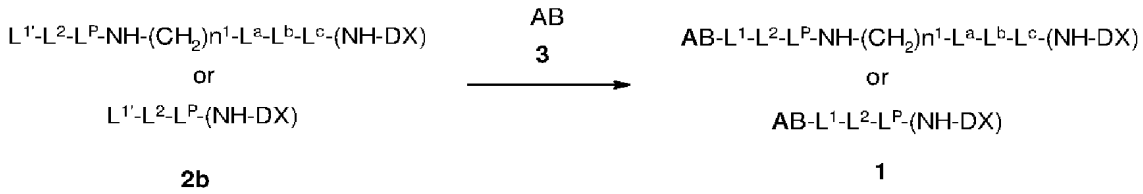
HS-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)

のものである。

[0246] ３．製造方法３

式（１）で示される抗体ー薬物コンジュゲート及びそれらの薬理上許容される塩のうち、、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)-$(CH_2)n^5$-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)-$(CH_2)n^5$-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。

[0247] [化44]



[0248] 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、抗体ー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ー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ーヒドロキシフタルイミジルエステル、Ｎー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ージニトロフェニルエステル、３ースルホニルー４ーニトロフェニルエステル、３ーカルボキシー４ーニトロフェニルエステ

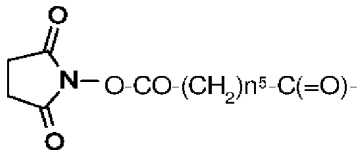
ル、ペンタフルオロフェニルエステル等も使用することができる。

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ー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、抗体ー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ーメチルー２ーピリドン（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。

製造した抗体ー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ー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)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-は次の構造を有する。

[0249] [化45]



[0250] 上記の部分構造を有し、Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドリンカーを有する化合物として以下のものを挙げることができる。

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-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)-DGGF-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)-DGGF-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)-DGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-KGGF-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)-DGGFG-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)-DGGFG-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)-DGGFG-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)-DGGFG-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)-KGGFG-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)-KGGFG-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)-KGGFG-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)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

[0251] これらのうちでより好ましくは以下のものである。

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-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)-DGGF-NH-C$H_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-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)-KGGF-NH-C$H_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-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)-DGGFG-NH-C$H_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

[0252] 上記の部分構造を有し、Ｎ末端に親水性アミノ酸を有するペプチドリンカーを有し、これが薬物に直結した化合物として以下のものを挙げることができる。

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)。

[0253] 上記の部分構造を有し、C末端にグリシンからなるオリゴペプチドを有するペプチドリンカーを有し、これが薬物に直結した化合物として以下のものを挙げることができる。

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)。

[0254] 上記の部分構造を有し、L^1に親水性構造を有する化合物として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(CH_2CH_2-COOH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-CH(CH_2CH_2-COOH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

[0255] 上記の部分構造を有し、L^1に親水性構造を有し、ペプチドリンカーが薬物に直結した化合物として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(CH_2CH_2-COOH)-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)。

[0256] 上記の部分構造を有し、L^2に親水性構造を有する化合物として以下のものを挙げることができる。

(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O

-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_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)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)。

[0257] 上記の部分構造を有し、L^2に親水性構造を有し、ペプチドリンカーが薬物に直結した化合物として以下のものを挙げることができる。

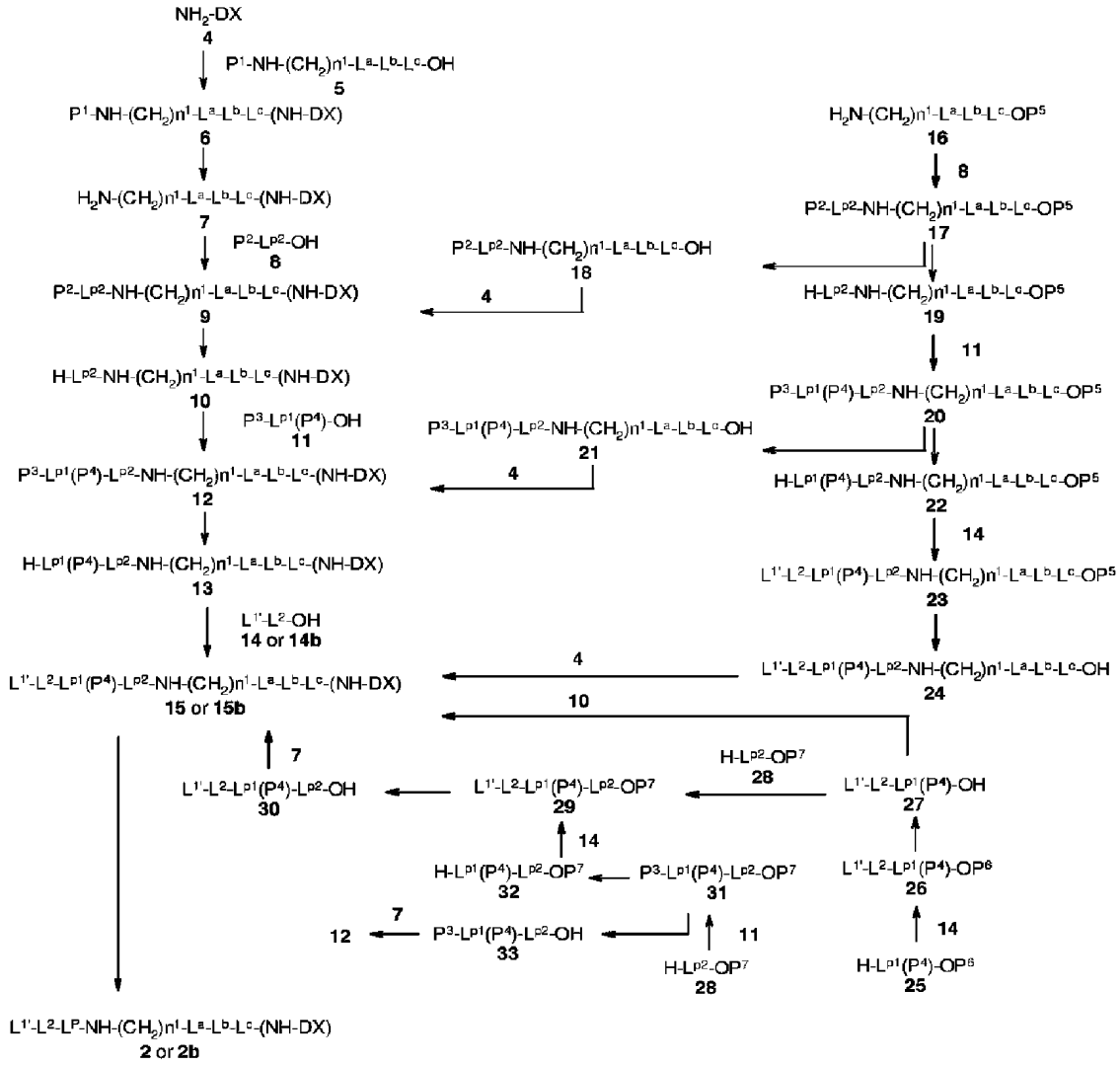
(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-N(-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-OH)-CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX)。

[0258] 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のうち、リンカーが、-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-で示される構造であり、L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基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。

[0259]

[化46-1]



[0260] [式中、Ｌ^{c}は、-C(=O)-基を、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)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-に変換された構造のＬ^{1}を、Ｌ^{P}は-Ｌ^{p1}－Ｌ^{p2}-からなる構造を、Ｐ^{1}、Ｐ^{2}、Ｐ^{3}、Ｐ^{4}、Ｐ^{5}、Ｐ^{6}及びＰ^{7}は保護基を示す。]

[0261] Ｌ^{P}は、Ｌ^{p1}及びＬ^{p2}を結合させて形成されるため、Ｌ^{P}のＮ末端の親水性アミノ酸はＬ^{p1}由来となるので、Ｌ^{p1}はＮ末端が親水性アミノ酸であるものを採用すればよい。なお、親水性アミノ酸は複数個であってよい。また、Ｌ^{p2}に親水性アミノ酸があるものを採用すれば、その位置に応じて、Ｌ^{P}のＮ末

端又はＮ末端とそれ以外の位置に親水性アミノ酸を複数個を含むＬ^{P}を製造することができる。

末端のアミノ基をＰ^{1}で保護したカルボン酸化合物（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］（特開平６－８７７４６号公報の請求項２に記載された医薬品化合物）（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り化合物（６）を製造することができる。

この反応は、アミド化および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化合物（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、カルボン酸化合物（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、カルボン酸化合物（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、カルボン酸化合物（５）とシアノホスホン酸ジエチルとの反応（塩入法）、カルボン酸化合物（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）、カルボン酸化合物（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、カルボン酸化合物（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り製造できる酸ハライド法等により反応を行うこともできる。上記のように得たカルボン酸化合物（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反応を阻害しない溶媒中で－７８℃～１５０℃で反応させることにより化合物（６）を製造することができる。

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。

本反応に用いる反応を阻害しない溶媒としては、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アルキル系溶媒、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が挙げられ、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、メタノール、エタノール等のアルコール系溶媒、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。

[0262] 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、２－（トリメチルシリル）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、この分野において通常実施される方法に従って行えばよい。

[0263] 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り化合物（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。

[0264] Ｎ末端をＰ[2]で保護したペプチド又はアミノ酸（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り、化合物（９）を製造することができる。ペプチド又はアミノ酸（８）と化合物（７）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は反応を阻害しないものであればよく、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。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く、その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、ペプチド又はアミノ酸（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り化合物（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。

Ｎ末端をＰ[3]で、側鎖のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基をＰ[4]で保護したアミノ酸又はペプチド（１１）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（１０）に反応させることにより、化合物（１２）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（１１）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、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[3]およびＰ[4]としては、化合物（６）のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基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。ただし、この場合に、アミノ基の保護基Ｐ[3]と側鎖の官能基の保護基Ｐ[4]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[3]が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、Ｐ[4]がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基など、水酸基の保護基であればメトキシメチル基など、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチ

ルオキシカルボニル基など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。側鎖の官能基の保護基Ｐ[4]は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無く、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基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薬や条件を選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられているように、化合物（１２）は構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応、脱保護を繰り返し、伸長させて製造することもできる。

得られた化合物（１２）の末端アミノ基の保護基Ｐ[3]を脱保護させることにより化合物（１３）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（１４）又は（１４ｂ）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（１３）に反応させることにより、化合物（１５）又は（１５ｂ）を製造することができる。ここでカルボン酸誘導体（１４）はＬ[1]’のリンカー末端がマレイミジル基又はハロアセチル基を有する構造の化合物であり、カルボン酸誘導体（１４ｂ）はＬ[1]’のリンカー末端が(Pyrrolidine-2,5-dione-N-yl)-O-C(=O)-を有する構造の化合物である。

カルボン酸誘導体（１４）又は（１４ｂ）と化合物（１３）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（１５）又は（１５ｂ）のペプチド部分のアミノ酸側鎖のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基の保護基Ｐ[4]を脱保護させることにより化合物（２）又は（２ｂ）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。

[0265] 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又はアミノ酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、末端のカルボキシ基をＰ[5]で保護したアミ

ン化合物（１６）と反応させることにより化合物（１７）を製造することができる。ペプチド又はアミノ酸（８）と化合物（１６）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（１７）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^5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P^2とカルボキシ基の保護基P^5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^5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薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（１７）のカルボキシ基の保護基P^5を脱保護させることにより化合物（１８）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（１８）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り化合物（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。

[0266] 化合物（１２）は例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（１７）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることにより化合物（１９）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。

アミノ酸又はペプチド（１１）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（１９）と反応させることにより化合物（２０）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（１１）と化合物（１９）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。ここで、アミノ酸又はペプチド（１１）の保護基P^3、P^4と化合物（１９）の保護基P^5がそれぞれ異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^3が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^4がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基やｔｅｒｔ－ブチル基、又はメトキシメチル基、P^5がベンジル基など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。また、上述したように側鎖の官能基の保護基P^4は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無く、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基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薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（２０）のカルボキシ基の保護基P^5を脱保護させることにより化合物（２１）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。

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、塩基存在下、化合物（４）と反応させることにより化合物（１２）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、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。

[0267] 化合物（１５）は例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（２０）のアミノ基の保護基P^3を脱保護させることにより化合物（２２）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（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、得られた化合物（２２）と反応させることにより化合物（２３）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１４）と化合物（２２）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（２３）のカルボキシ基の保護基P^5を脱保護させることにより化合物（２４）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。

化合物（２４）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り化合物（１５）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。

[0268] 化合物（１５）は例えば下記の方法でも製造することができる。

カルボン酸誘導体（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、カルボキシ基をP^6で、側鎖のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基をP^4で保護したアミノ酸又はペプチド（２５）と反応させることにより化合物（２６）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１４）と化合物（２５）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。ここで化合物（２６）の保護基P^4およびP^6としては、化合物（６）のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基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。ただし、この場合に、カルボキシ基の保護基P^6と側鎖の官能基の保護基P^4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^6がベンジル基であり、P^4がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基など、水酸基の保護基であればメトキシメチル基など、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基など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。側鎖の官能基の保護基P^4は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定され

ることは無く、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基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薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（２６）のカルボキシ基の保護基P^6を脱保護させることにより化合物（２７）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。

化合物（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（１０）と反応させることにより化合物（１５）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。

また、化合物（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、カルボキシ基をP^7で保護したアミノ酸又はペプチド（２８）と反応させることにより化合物（２９）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。ここで化合物（２９）の保護基P^4およびP^7としては、化合物（６）のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基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。ただし、この場合に、カルボキシ基の保護基P^7と側鎖の官能基の保護基P^4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^7がベンジル基であり、P^4がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基など、水酸基の保護基であればメトキシメチル基など、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基など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。側鎖の官能基の保護基P^4は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無く、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基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薬や条件を選択すれ

ばよい。また、化合物（２９）は構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応、脱保護を繰り返し、伸長させて製造することもできる。

得られた化合物（２９）のカルボキシ基の保護基P^7を脱保護させることにより化合物（３０）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。

化合物（３０）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（７）と反応させることにより化合物（１５）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（２９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

アミノ酸又はペプチド（２８）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、Ｎ末端をP^3で、側鎖のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基をP^4で保護したアミノ酸又はペプチド（１１）と反応させることによりペプチド（３１）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（２８）とアミノ酸又はペプチド（１１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。ここでアミノ酸又はペプチド（２８）のカルボキシ基の保護基P^7と、アミノ酸またはペプチド（１１）の保護基P^3およびP^4としては、上述のとおりであるが、互いに異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^3が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^4がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基など、水酸基の保護基であればメトキシメチル基など、アミノ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基などであり、P^7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。側鎖の官能基の保護基P^4は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無く、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基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薬や条件を選択すればよい。

得られたペプチド（３１）のＮ末端の保護基P^3を脱保護させることによりペプチド（３２）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（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、得られたペプチド（３２）と反応させることにより化合物（２９）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１４）とペプチド（３２）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（１２）は例えば下記の方法でも製造することができる。

上述のペプチド（３１）のＣ末端の保護基P^7を脱保護させることによりペプチド（３３）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。

得られたペプチド（３３）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、上述の化合物（７）と反応させることにより化合物（１２）を製造することができる。ペプチド（３３）と化合物（７）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

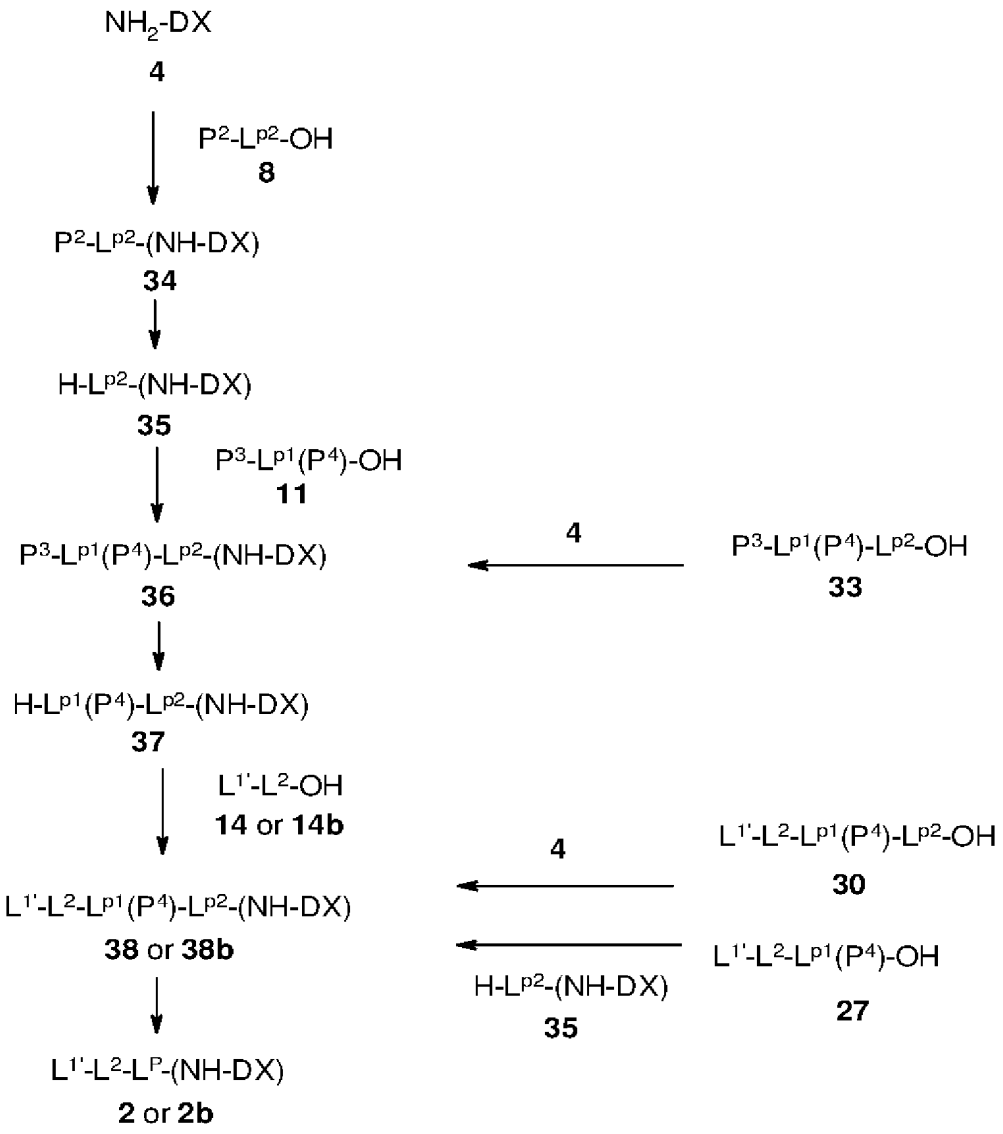
[0269] ５．製造方法５

式（２）又は（２ｂ）で示される製造中間体のうち、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造であり、L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合は下記の方法によっても製造することができる。

[0270]

OnCusp
Ex. 1038

[化46-2]



[0271] [式中、は、Ｌ１’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)-$(CH_2)_{n5}$-C(=O)-に変換された構造のＬ１を、ＬＰは-Ｌｐ１－Ｌｐ２-からなる構造を、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、及びＰ７は保護基を示す。]

[0272] ＬＰは、Ｌｐ１及びＬｐ２を結合させて形成されるため、ＬＰのＮ末端の親水性アミノ酸はＬｐ１由来となるので、Ｌｐ１はＮ末端が親水性アミノ酸であるものを採用すればよい。なお、親水性アミノ酸は複数個であってよい。また、Ｌｐ２に親水性アミノ酸があるものを採用すれば、その位置に応じて、ＬＰのＮ末

端又はＮ末端とそれ以外の位置に親水性アミノ酸を複数個を含むＬ^{P}を製造することができる。

製造方法４に記載のＮ末端をＰ^{2}で保護したペプチド又はアミノ酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、化合物（４）及びその塩に反応させることにより、化合物（３４）を製造することができる。ペプチド又はアミノ酸（８）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は反応を阻害しないものであればよく、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、ペプチド又はアミノ酸（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、伸長させて化合物（３４）を製造することもできる。

得られた化合物（３４）のアミノ基の保護基Ｐ^{2}を脱保護させることにより化合物（３５）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。

製造方法４に記載の、Ｎ末端をＰ^{3}で、側鎖のカルボキシ基、水酸基又はアミノ基をＰ^{4}で保護したアミノ酸又はペプチド（１１）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（３５）に反応させることにより、化合物（３６）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（１１）と化合物（３５）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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^{3}およびＰ^{4}としては、製造方法４に記載したとおりである。また、ペプチド合成に通常用いられているように、化合物（３６）は構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応、脱保護を繰り返し、伸長させて製造することもできる。

得られた化合物（３６）のアミノ基の保護基Ｐ^{3}を脱保護させることにより化合物（３７）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（１４）又は（１４ｂ）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（３７）に反応させることにより、化合物（３８）又は（３８ｂ）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１４）又は（１４ｂ）と化合物（３７）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（３８）又は（３８ｂ）のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基の保護基P^4を脱保護させることにより化合物（２）又は（２ｂ）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。

[0273] 化合物（３６）は例えば下記の方法でも製造することができる。

製造方法４に記載のペプチド（３３）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（４）またはその塩に反応させることにより、化合物（３６）を製造することができる。ペプチド（３３）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

[0274] 化合物（３８）は例えば下記の方法でも製造することができる。

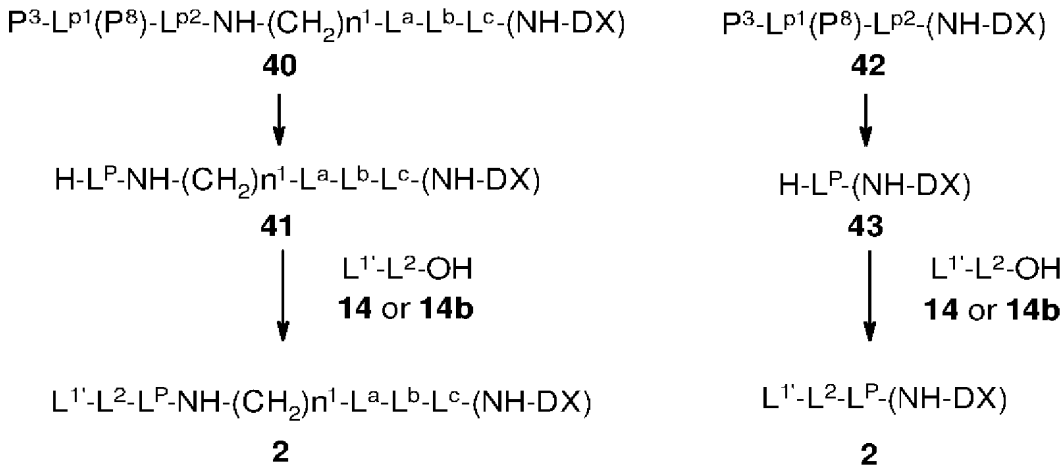
製造方法４に記載の化合物（３０）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることにより、又は製造方法４に記載のアミノ酸又はペプチド（２７）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、上述の化合物（３５）と反応させることにより、化合物（３８）を製造することができる。それぞれのペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0275] ６．製造方法６

式（２）で示される製造中間体のうち、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$又は$-L^1-L^2-L^P-$のいずれかの構造を有し、$L^P$が、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有する

ペプチド残基である場合は、例えば下記の方法によっても製造することができる。

[0276] [化47]



[0277] [式中、Ｌ１’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)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-に変換された構造のＬ１を、Ｌ^{P}は-Ｌ^{p1}－Ｌ^{p2}-からなる構造を、Ｐ３、Ｐ８は、保護基を示す。]

[0278] 式（２）で示される製造中間体には、リンカーが、-L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-で示される構造と、-L^1-L^2-L^P-で示される構造の二つの態様がある。

リンカーが、-L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-で示される構造の化合物（２）は以下のように製造することができる。

化合物（４０）は製造方法４に記載の化合物（１２）と同様に合成することができるが、化合物（１２）と異なり、そのアミノ基の保護基Ｐ３と側鎖の官能基の保護基Ｐ８を異なる方法または条件で除去できる必要はなくてもよい。側鎖の官能基はカルボキシ基又は水酸基であり、そのアミノ基の保護基Ｐ３と側鎖のカルボキシ基又は水酸基の保護基Ｐ８を同時に脱保護させることもできる。例えばＰ３がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、Ｐ８がｔｅｒｔ－ブチル基やトリチル基、あるいはＰ３がベンジルオキシカルボニル基であり、Ｐ８がベンジル基など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、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて化合物（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、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薬や条件を選択すればよい。化合物（４０）は、上記の性質を満たす保護されたアミノ酸またはペプチドを用いれば、製造方法４と同様に合成することができる。

化合物（４０）の保護基P^3、P^8を順次又は同時に脱保護させることにより化合物（４１）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。

化合物（４１）は、L^Pの親水性側鎖の官能基は特に保護されていないが、塩基存在下、活性エステル、混合酸無水物等に誘導した化合物（１４）又は（１４ｂ）と反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。それぞれのペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の化合物（２）は以下のように製造することができる。

化合物（４２）も製造方法５に記載の化合物（３６）と同様に合成することができるが、化合物（３６）と異なり、そのアミノ基の保護基P^3と側鎖の官能基の保護基P^8を異なる方法または条件で除去できる必要はなくてもよい。側鎖の官能基はカルボキシ基又は水酸基であり、そのアミノ基の保護基P^3と側鎖のカルボキシ基又は水酸基の保護基P^8を同時に脱保護させることもできる。例えばP^3がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^8がｔｅｒｔ－ブチル基やトリチル基、あるいはP^3がベンジルオキシカルボニル基であり、P^8がベンジル基など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、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて化合物（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、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薬や条件を選択すればよい。化合物（４２）は、上記の性質を満たす

保護されたアミノ酸またはペプチドを用いれば、製造方法５と同様に合成することができる。

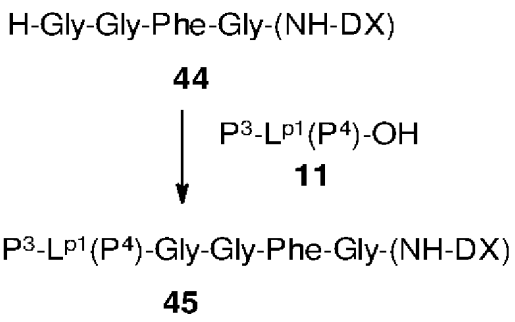
化合物（４２）の保護基Ｐ^{3}、Ｐ^{8}を順次又は同時に脱保護させることにより化合物（４３）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

化合物（４３）は、Ｌ^{P}の親水性側鎖の官能基は特に保護されていないが、塩基存在下、活性エステル、混合酸無水物等に誘導した化合物（１４）又は（１４ｂ）と反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。それぞれのペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

[0279] ７．製造方法７

製造方法５に示される化合物（３６）のうち、リンカー-L^{P}-が、-L^{p1}-Gly-Gly-Phe-Gly-からなる構造を有する場合は下記の方法によっても製造することができる。

[0280] [化48]



[0281] [式中、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)n^{5}-C(=O)-に変換された構造のＬ^{1}を、-L^{P}-は-L^{p1}-Gly-Gly-Phe-Gly-からなる構造を、Ｐ^{3}、Ｐ^{4}は、保護基を示す。]

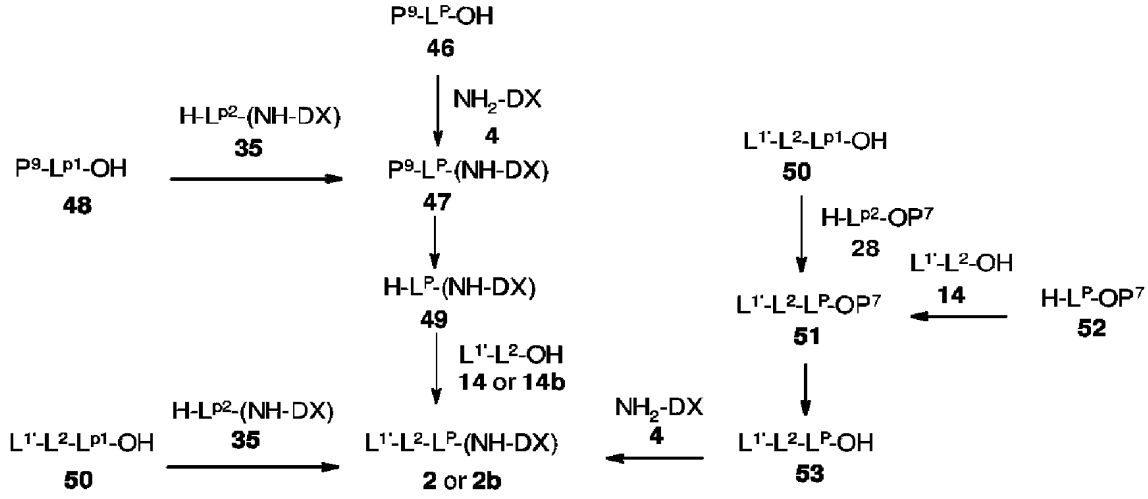
[0282] 製造方法４に記載のアミノ酸又はペプチド（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、グリシルグリシルーＬーフェニルアラニルーＮー［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチルー５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチルー１０，１３－ジオキソー２，３，９，１

０，１３，１５－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］グリシンアミド（ＷＯ９７／４６２６０に記載された医薬化合物のフリー体）（４４）及びその塩と反応させることにより化合物（４５）を製造することができる。アミノ酸又はペプチド（１１）と化合物（４４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。Ｎ末端の保護基P^3、側鎖の官能基の保護基P^4としては、製造方法４にて上述のとおりである。なお、側鎖の官能基の保護基P^4は無くてもよく、Ｎ末端のみを保護したアミノ酸又はペプチド（１１）を用いて反応を行い、化合物（４５）を得ることができる。

[0283] ８．製造方法８

式（２）又は（２ｂ）で示される化合物のうち、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造であり、L^Pが、そのＣ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって薬物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合は例えば下記の方法でも製造できる。

[0284] [化49]



[0285] [式中、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)-$(CH_2)n^5$-C(=O)-に変換された構造の

L^1を、L^PはL^{p1}－L^{p2}からなる構造を、P^7及びP^9は、保護基を示す。］

［0286］　L^Pは，L^{p1}及びL^{p2}を結合させて形成されるので、これらに含まれるL^PのＣ末端を構成するためグリシンの数は、L^Pが有するＣ末端のグリシンの数、さらに反応時にこれらを使用する反復回数を考慮して設計すればよい。

ペプチド（４６）はそのＣ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであり、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基であり、そのＮ末端はP^9で保護している。ペプチド（４６）はペプチド合成に通常用いられているように、その構成するアミノ酸またはペプチドを順次縮合反応と脱保護を繰り返して合成できる。

ペプチド（４６）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、化合物（４）又はその塩に反応させることにより、化合物（４７）を製造することができる。ペプチド（４６）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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^9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。

また、化合物（４７）は、Ｎ末端をP^9で保護したアミノ酸又はペプチド（４８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、製造方法５に記載の化合物（３５）に反応させることによっても製造することができる。アミノ酸又はペプチド（４８）と化合物（３５）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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^9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（４７）のアミノ基の保護基P^9を脱保護させることにより化合物（４９）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（１４）又は（１４ｂ）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（４９）に反応させるこ

とにより、化合物（２）又は（２ｂ）を製造することができる。カルボン酸誘導体（１４）又は（１４ｂ）と化合物（４９）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（２）は下記の方法でも製造することができる。

化合物（５０）はL^{p1}のＮ末端のグリシンがL^{2}と結合し、製造方法４に記載の化合物（２７）と同様に合成することができる。製造方法４に記載したアミノ酸又はペプチド（２８）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（５０）に反応させることにより、化合物（５１）を製造することができる。ここで、ここで、アミノ酸又はペプチド（２８）は、グリシンか又はそのＣ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであり、そのＣ末端をP^{7}で保護されている。アミノ酸又はペプチド（２８）と化合物（５０）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（５１）は、化合物（１４）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、Ｃ末端をP^{7}で保護したペプチド（５２）に反応させることによっても製造することができる。ここで、ペプチド（５２）はそのＣ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであり、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である。ペプチド（５２）はペプチド合成に通常用いられているように、その構成するアミノ酸またはペプチドを順次縮合反応と脱保護を繰り返して合成できる。ペプチド（５２）と化合物（１４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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^{7}は、酸条件で脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無く、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（５１）のカルボキシ基の保護基P^{7}を脱保護させることに

より化合物（５３）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。

化合物（５３）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、化合物（４）又はその塩に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。化合物（５３）と化合物（４）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

他に化合物（２）は下記の方法でも製造することができる。

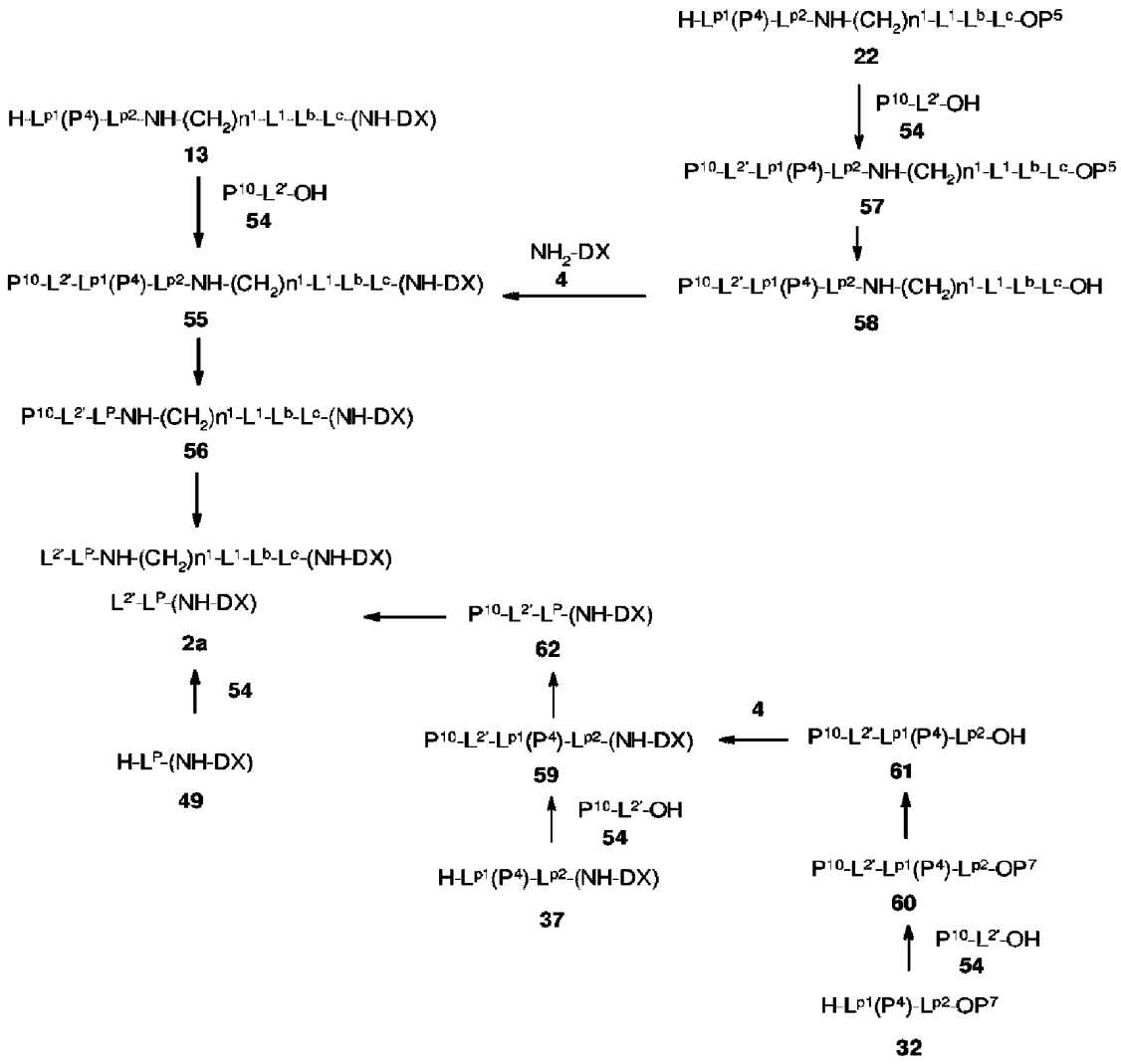
製造方法５に記載の化合物（３５）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、化合物（５０）に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。化合物（５０）と化合物（３５）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0287] ９．製造方法９

製造方法２に記載される式（２ａ）で示される製造中間体であって、$L^{2'}$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。

[0288]

[化50]



[0289] [式中、L^PはL^{p1}－L^{p2}からなる構造を、P^4、P^5、P^7、P^{10}は、保護基を示す。]

[0290] 式（２ａ）で示される製造中間体には、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造と、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の二つの態様がある。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造の化合物（２a）は以下のように製造することができる。

末端のメルカプト基をP^{10}で保護したカルボン酸化合物（５４）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、製造方法４に記載の化合物（１３）

に反応させることにより、化合物（５５）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。メルカプト基の保護基P^{10}としては、有機合成化学においてメルカプト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Ｓ－メチルスルフィド基、Ｓ－エチルスルフィド基、Ｓ－２－ピリジルスルフィド基等のスルフィド基、アセチル基等のエステル基、ベンジル基、９－フルオレニルメチル基、トリチル基等のアリールメチルエーテル基、Ｓ－２－シアノエチル基等のエチルエーテル基等から適宜選択して使用すればよい。この場合に、L^{p1}の側鎖のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の保護基P^{4}としては、酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無く、保護する化合物のアミノ基、カルボキシ基又は水酸基の性質等に応じて上述したものから取捨選択して使用すればよいが、メルカプト基の保護基P^{10}は、L^{p1}の側鎖のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基の保護基P^{4}とは異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばカルボキシ基の場合には保護基P^{4}がｔｅｒｔ－ブチル基であり、保護基P^{10}がＳ－メチルスルフィド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。また、保護基P^{10}は存在しなくともよく、この場合は化合物（５５）のメルカプト基は無保護の状態で存在する。

得られた化合物（５５）のL^{p1}の側鎖のカルボキシ基又は水酸基、アミノ基の保護基P^{4}を脱保護させることにより化合物（５６）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（５６）のメルカプト基の保護基P^{10}を脱保護させることにより化合物（２ａ）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。

化合物（５５）は下記の方法でも製造することができる。

上述のメルカプト基をP^{10}で保護したカルボン酸化合物（５４）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、製造方法４に記載

の化合物（２２）と反応させることにより、化合物（５７）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^4及びP^{10}は上述のとおりであり、カルボキシ基の保護基P^5としては、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が、メルカプト基の保護基P^{10}及び側鎖の官能基の保護基P^4は、カルボキシ基の保護基P^5とは異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばP^4がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基であり、P^{10}がＳ－メチルスルフィド基、P^5がアリ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。また、P^{10}は存在しなくともよく、この場合は化合物（５７）のメルカプト基は無保護で存在する。

得られた化合物（５７）のカルボキシ基の保護基P^5を脱保護させることにより化合物（５８）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。

化合物（５８）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り化合物（５５）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。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の化合物（２ａ）であり、L^Pが、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合には、以下のように製造することができる。

上述のメルカプト基をP^{10}で保護したカルボン酸化合物（５４）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、製造方法５に記載の化合物（３７）に反応させることにより、化合物（５９）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[4]及びＰ[10]は上述のとおりである。

化合物（５９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

メルカプト基をＰ[10]で保護したカルボン酸化合物（５４）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、製造方法４に記載のペプチド（３２）に反応させることにより、化合物（６０）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[4]、Ｐ[7]及びＰ[10]は上述のとおりであり、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が、メルカプト基の保護基Ｐ[10]及び側鎖の官能基の保護基Ｐ[4]は、カルボキシ基の保護基Ｐ[7]とは異なる方法又は条件で除去できる必要がある。例えばＰ[4]がカルボキシ基の保護基であればｔｅｒｔ－ブチル基であり、Ｐ[10]がＳ－メチルスルフィド基、Ｐ[7]がアリ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。また、Ｐ[10]は存在しなくともよく、この場合は化合物（６０）のメルカプト基は無保護で存在する。

得られた化合物（６０）のペプチドのカルボキシ基の保護基Ｐ[7]を脱保護させることにより化合物（６１）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（６１）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）またはその塩と反応させることにより化合物（５９）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（５９）のＬ[P1]の側鎖の保護基Ｐ[4]を脱保護させることにより化合物（６２）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（６２）のメルカプト基の保護基Ｐ^{10}を脱保護させることにより化合物（２ａ）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。

リンカーが、-L^1-L^2-L^P-で示される構造の化合物（２a）であり、L^Pが、そのＣ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって薬物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合には、以下のように製造することができる。

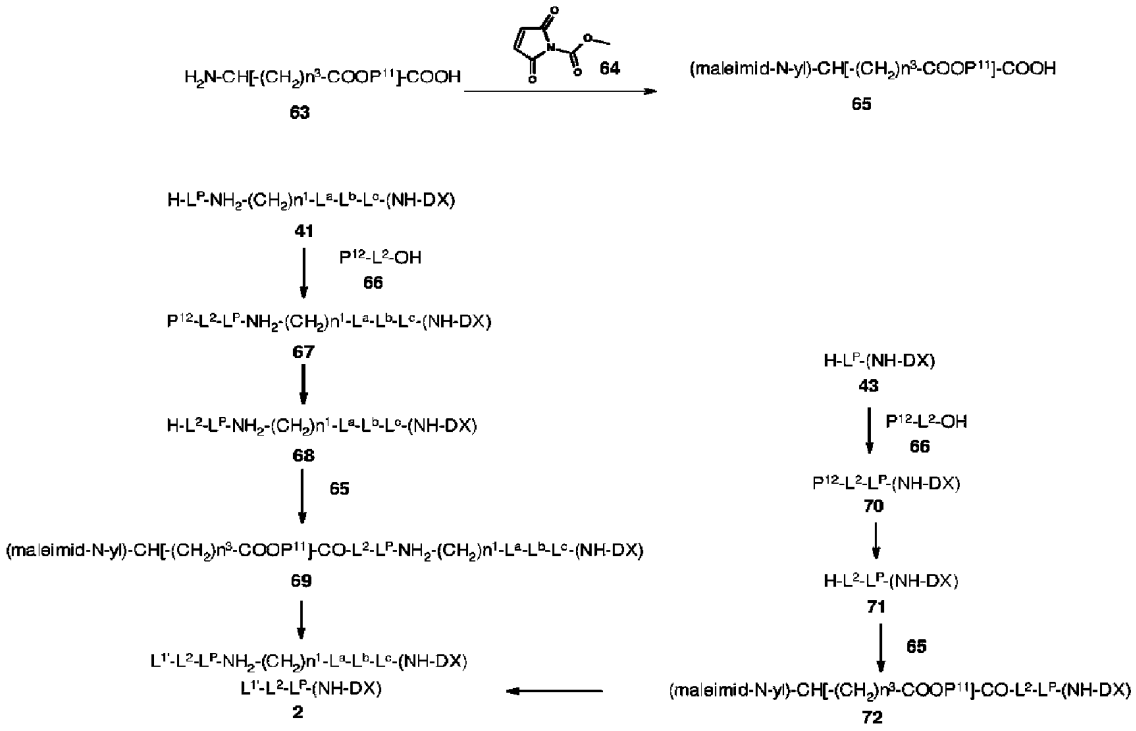
カルボン酸化合物（５４）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、製造方法８に記載の化合物（４９）に反応させることにより、化合物（２a）を製造することができる。ここで、メルカプト基はＰ^{10}で保護してなくてもよい。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び塩基や溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0291] １０．製造方法１０

式（２）で示される製造中間体のうち、Ｌ$^{1'}$が末端(maleimid-N-yl)-CH[-(CH_2)n^3-COOH]-C(=O)-に変換された構造のＬ^{1}は、下記の方法によって製造することができる。

[0292]

［化51］



［0293］［式中、Ｐ１１、Ｐ１２は、保護基を示す。］

［0294］　式（２）で示される製造中間体には、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造と、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の二つの態様がある。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造の化合物（２）は以下のように製造することができる。

側鎖のカルボキシ基をＰ１１で保護したアミノ酸（６３）とＮ－メトキシカルボニルマレイミド（６４）を水中、重曹等の塩基存在下、－４０℃から１００℃で反応させることにより、(maleimid-N-yl)-化した化合物（６５）を製造することができる。マレイミジル化合物はアミノ基を有する化合物からＮ－メトキシカルボニルマレイミドを用いて公知の方法（例えばＫｅｌｌｅｒ，　Ｏ．；　Ｒｕｄｉｎｇｅｒ，　Ｊ．　Ｈｅｌｖ．　Ｃｈｅｍ．　Ａｃｔａ　１９７５，　５８（２），　５３１-５４１．）又はそれに準ずる方法により合成することができる。カルボキシ基の保護基Ｐ１１としては、有機合

成化学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、酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無い。

末端のアミノ基をP^{12}で保護した化合物（６６）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、製造方法６に記載した化合物（４１）と反応させることにより化合物（６７）を製造することができる。化合物（６７）と化合物（４１）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（６６）のアミノ基の保護基P^{12}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（６７）のアミノ基の保護基P^{12}を脱保護させることにより化合物（６８）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。

上述した化合物（６５）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（６８）と反応させることにより化合物（６９）を製造することができる。化合物（６５）と化合物（６８）のアミド結合形成の反応条件や試薬、及び塩基、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（６９）のカルボキシ基の保護基P^{11}を脱保護させることにより化合物（２）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。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の化合物（２）は以下のように製造することができる。

同様に末端のアミノ基をP^{12}で保護した化合物（６６）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、製造方法６に記載した化合物（４３）と反応させることにより化合物（７０）を製造することができる。化合物（６６）と化合物（４３）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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^{12}は上述のとおりである。

得られた化合物（７０）のアミノ基の保護基Ｐ^{12}を脱保護させることにより化合物（７１）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。

上述した化合物（６５）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（７１）と反応させることにより化合物（７２）を製造することができる。化合物（６５）と化合物（７１）のアミド結合形成の反応条件や試薬、及び塩基、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。

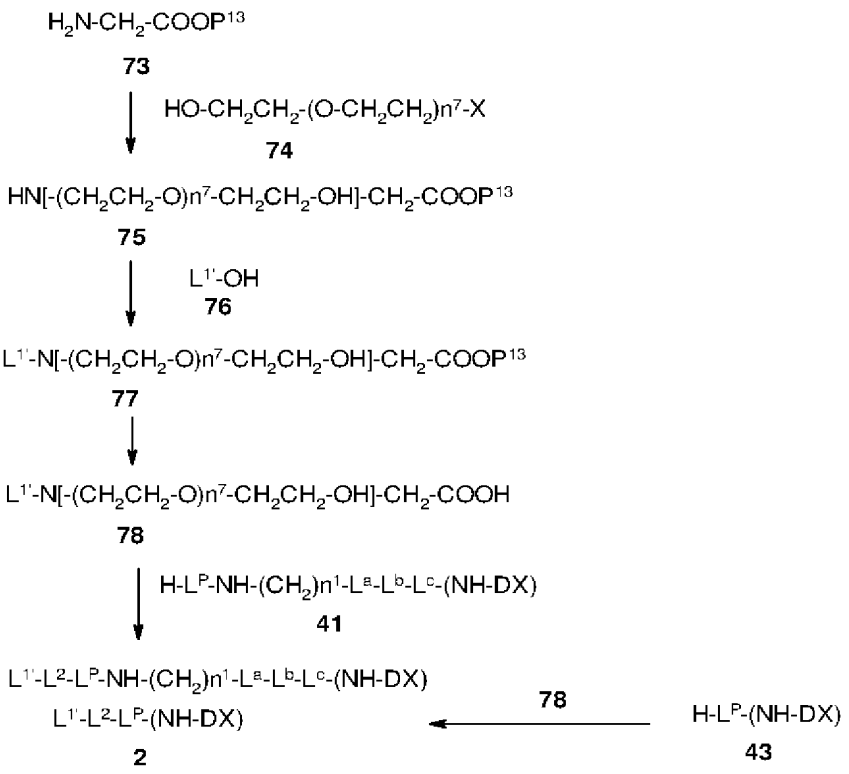
得られた化合物（７２）のカルボキシ基の保護基Ｐ^{11}を脱保護させることにより化合物（２）を製造することができる。その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

[0295] １１．製造方法１１

式（２）で示される製造中間体のうち、Ｌ$^{1'}$が、末端マレイミジル基又は末端ハロアセチル基に変換された構造のＬ^{1}であり、Ｌ^{2}が-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-であるものは、下記の方法によって製造することができる。

[0296]

［化52］



［0297］［式中、Ｐ１３は、保護基を、Ｘは、脱離基を示す。］

［0298］　式（２）で示される製造中間体には、リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造と、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の二つの態様がある。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造の化合物（２）は以下のように製造することができる。

Ｃ末端をＰ１３で保護したグリシン誘導体（７３）を、塩基存在下、化合物（７４）と反応させることにより化合物（７５）を製造することができる。カルボキシ基の保護基Ｐ１３は酸性条件に付すことによって脱保護可能な保護基が好ましいが、これに限定されることは無い。化合物（７４）の脱離基Ｘはｐ－トルエンスルホネート、メチルスルホネート、トリフルオロメチルスルホネート等、スルホン酸エステルのほか、ヨウ素、臭素、塩素等ハロゲン化物等を挙げることができる。この反応はＮ－アルキル化に通常用いる反応

条件を準用すればよく、塩基、溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから取捨選択すればよい。

カルボン酸誘導体（７６）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（７５）に反応させることにより、化合物（７７）を製造することができる。カルボン酸誘導体（７６）と化合物（７５）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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（７７）のカルボキシ基の保護基P^{13}を脱保護させることにより化合物（７８）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（７８）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、製造方法６に記載の化合物（４１）に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。カルボン酸誘導体（７８）と化合物（４１）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-$で示される構造の化合物（２）は以下のように製造することができる。

同様に、化合物（７８）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、製造方法６に記載の化合物（４３）に反応させることにより、化合物（２）を製造することができる。カルボン酸誘導体（７８）と化合物（４３）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、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。

なお、製造方法１から製造方法１１の中間体の化合物はいずれも塩となってもよい。

[0299] なお、本発明の抗体ー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－13（^{13}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。

[0300] ［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。

[0301] 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。

[0302] 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。

[0303] 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。

[0304] 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。

[0305] 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。

[0306] 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。

[0307] 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。

[0308] 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。

[0309] 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

[0310] 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く、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されない。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。

[0311] 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抗体とした。

[0312] 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抗体とした。

[0313] 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。

[0314] 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に示した。

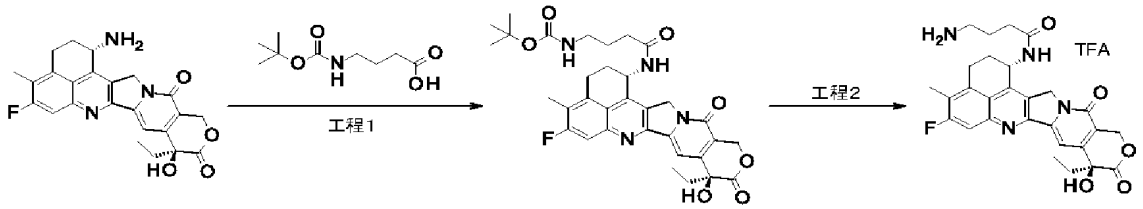
[0315] 参考例５　抗ＣＤ７０抗体

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。

[0316] 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］ブタナミド

[0317] [化53]



[0318] 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）カルバメート

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－（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（０．２１６ｇ、１．１３ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。その反応溶液を化合物（４）のメタンスルホン酸塩（０．５００ｇ、０．９４１ｍｍｏＬ）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（１０．０ｍＬ）に滴下し、室温にて１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）を濃黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３１（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），５．５５－５．５９（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）$^{+}$

[0319] 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］ブタナミド

上記工程１で得た化合物（０．３８８ｇ、０．６２６ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（９．００ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（９．００ｍＬ）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（０．３４３ｇ、定量的）のトリフルオロ酢酸塩を黄色固体として得た。

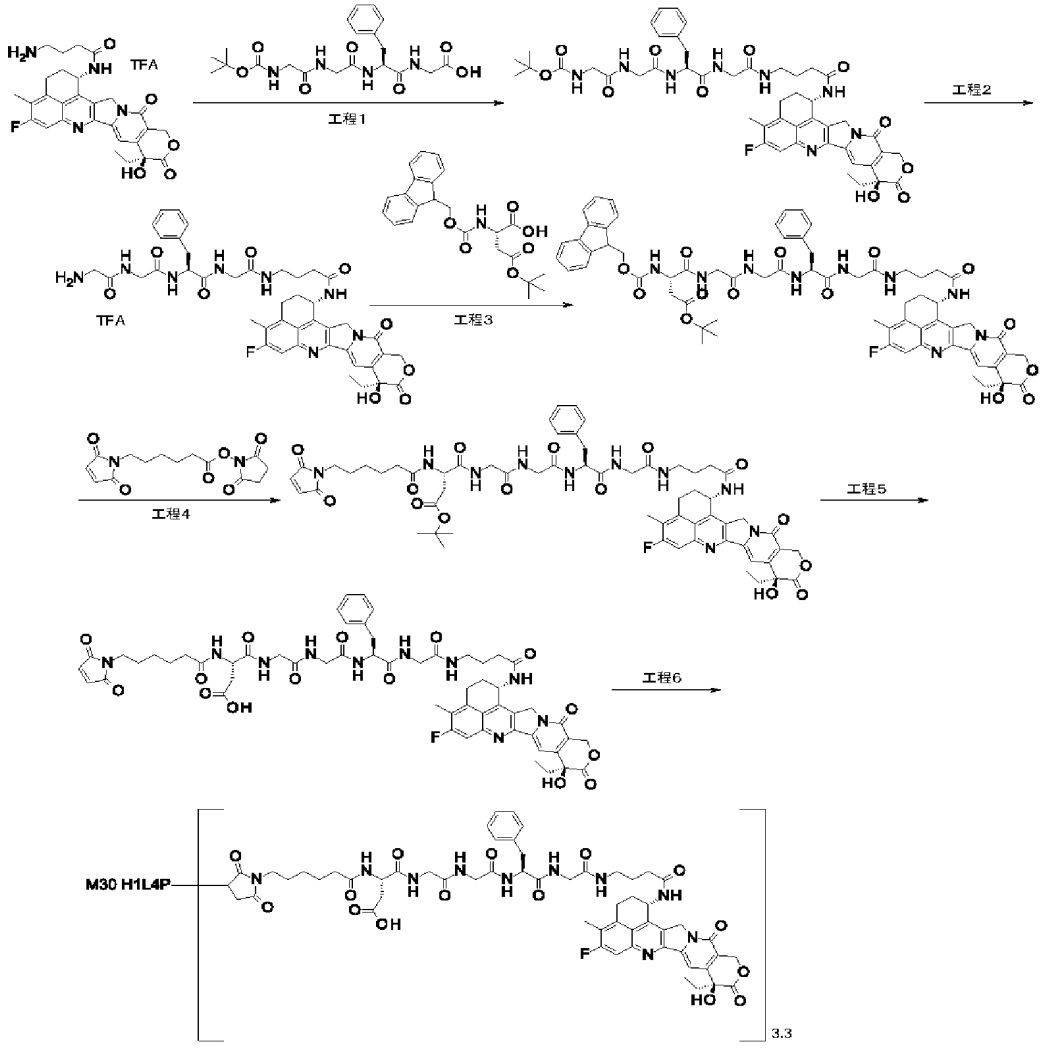
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．７９－１．９２（４Ｈ，ｍ），２．１０－２．１７（２Ｈ，ｍ），２．２７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．８０－２．８６（２Ｈ，ｍ），３．１５－３．２０（２Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７２（３Ｈ，ｂｒｓ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５２１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

OnCusp
Ex. 1038

[0320] 実施例２：抗体－薬物コンジュゲート（１）

[0321] [化54]



[0322] 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）グリシナミド

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（８０．９ｍｇ、０．１８５ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（３．００ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（２１．３ｍｇ、０．１８５ｍｍｏＬ）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（３５．５ｍｇ、０．１８５ｍｍｏＬ）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（８０．４ｍｇ、０．１５４ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド溶液（１．５０ｍＬ）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），１．３６（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）$^{+}$

[0323] 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）グリシナミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程１で得た化合物（７２．６ｍｇ、７７．３μｍｏＬ）を実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（６４．８ｇ、定量的）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），１．７１－１．７３（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）$^{+}$

[0324] 工程３：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－１２－ベンジル－２１－｛［（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－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－４，７，１０，１３，１６，２１－ヘキサオキソ－５，８，１１，１４，１７－ペンタアザヘニコサ

ン－１－ノエート

（２Ｓ）－４－ｔｅｒｔ－ブトキシ－２－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－４－オキソブタン酸（０．６２５ｇ、１．５２ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１０．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１７５ｇ、１．５２ｍｏＬ）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（０．２９１ｇ、１．５２ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。その反応溶液を上記工程２で得た化合物（１．００ｇ、１．０１ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド溶液（１０．０ｍＬ）に滴下し、室温にて２０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（０．８７３ｇ、７０％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．６８－１．７８（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９３（２Ｈ，ｍ），２．１０－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），２．６８－２．８５（３Ｈ，ｍ），２．９９－３．２２（５Ｈ，ｍ），３．５８－３．８１（６Ｈ，ｍ），４．１９－４．３６（３Ｈ，ｍ），４．３８－４．５２（２Ｈ，ｍ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．３４（８Ｈ，ｍ），７．４１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），７．６６－７．７５（４Ｈ，ｍ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．０１－８．０６（１Ｈ，ｍ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．１７－８．２２（１Ｈ，ｍ），８．２５－８．３０（１Ｈ，ｍ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１２３２（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0325] 工程４：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－１２－ベンジル－３－｛［

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］アミノ｝－２１－｛［（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｝－４，７，１０，１３，１６，２１－ヘキサオキソ－５，８，１１，１４，１７－ペンタアザヘニコサン－１－ノエート

上記工程３で得た化合物（０．８００ｇ、０．６４９ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（３．００ｍＬ）に溶解し、ピペリジン（０．６４３ｍＬ、６．４９ｍｍｏＬ）を加え１時間撹拌した。溶媒を減圧乾固し、得られた残留物をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）に溶解した。６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．３００ｇ、０．９７４ｍｍｏＬ）を加え、２０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（０．２２４ｇ、２９％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），１．１５－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．４４－１．４７（４Ｈ，ｍ），１．７１－１．７３（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．１３－２．２０（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．６７（１Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１１．１，４．８Ｈｚ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．６，９．４Ｈｚ），２．９９－３．１７（６Ｈ，ｍ），３．３１－３．３６（２Ｈ，ｍ），３．５７－３．７６（６Ｈ，ｍ），４．４５－４．４７（１Ｈ，ｍ），４．５７－４．６０（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ）

，７．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０９－８．１２（３Ｈ，ｍ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），８．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１２０３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0326] 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］－Ｌ－α－アスパラチ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）グリシナミド

上記工程４で得た化合物（０．２２４ｇ、０．１８６ｍｍｏＬ）を実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（２１．２ｍｇ、１０％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１３－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．４２－１．４５（６Ｈ，ｍ），１．７０－１．７２（２Ｈ，ｍ），１．８５－１．８８（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２０（６Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．６３－２．６７（１Ｈ，ｍ），２．７８－２．８１（１Ｈ，ｍ），３．０４－３．１２（６Ｈ，ｍ），３．６３－３．７０（６Ｈ，ｍ），４．４６－４．５２（２Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１８－７．２３（６Ｈ，ｍ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９９－８．０２（１Ｈ，ｍ），８．１０－８．１１（３Ｈ，ｍ），８．２７－８．３０（１Ｈ，ｍ），８．４７－８．５０（１Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１１４７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0327] 工程６：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（８．０ｍＬ）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（０．１２４ｍＬ；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．；０．４００ｍＬ）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り、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（０．２４９ｍＬ；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（０．０５０ｍＬ；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１８．５ｍＬ得た。

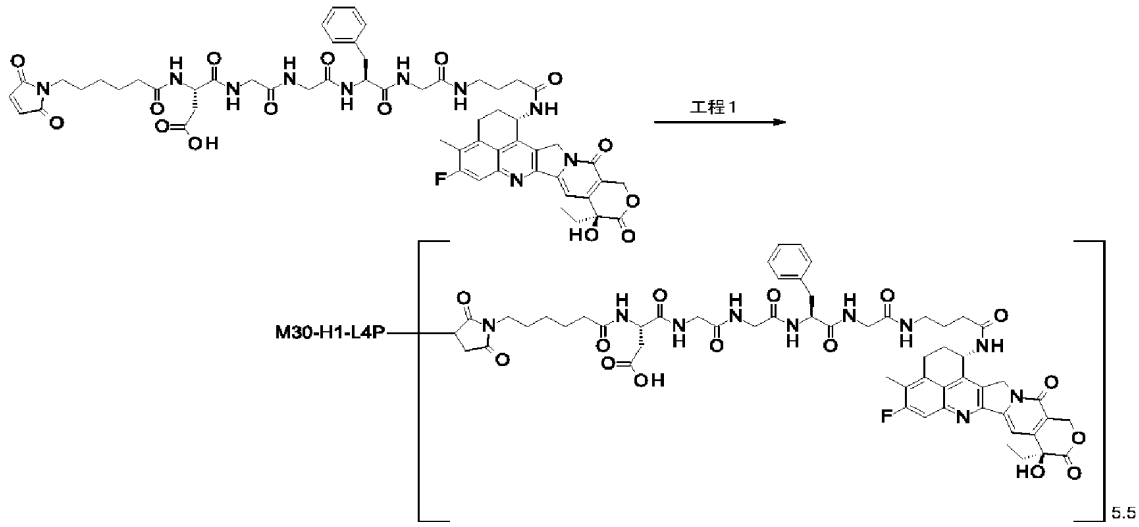
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：３．５６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６６ｍｇ（８３％），抗体一分

子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．３

[0328] 実施例３：抗体－薬物コンジュゲート（２）

[0329] [化55]



[0330] 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（８．０ｍＬ）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（０．１８７ｍＬ；抗体一分子に対して３．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．４００ｍＬ）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り、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５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．３７３ｍＬ；抗体一分子に対して６．９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０．０７５ｍＬ（抗体一分子に対して１３．８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。

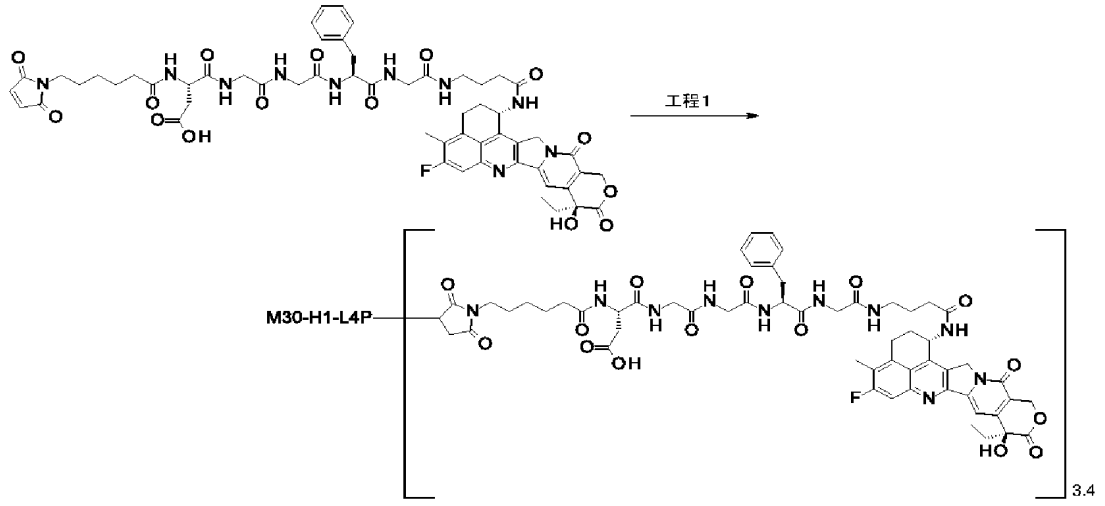
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を１６ｍＬ得た。

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：３．５５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５７ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．５

[0331] 実施例４：抗体－薬物コンジュゲート（３）

[0332] [化56]



[0333] 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（０．０２５ｍＬ；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）と実施例２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（０．０３９ｍＬ；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、共通方法Ａを使用して、溶液を濃縮した。

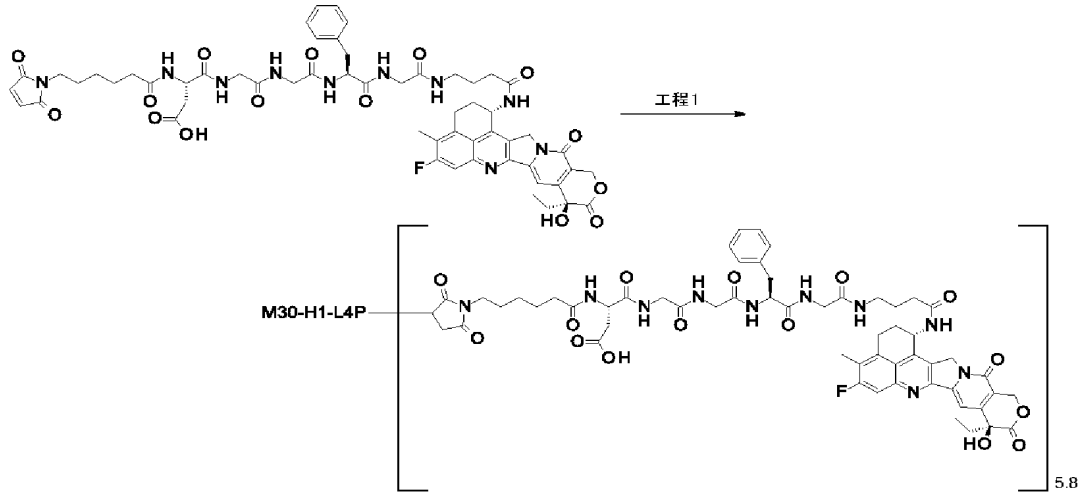
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．６３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．４ｍｇ（５９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0334] 実施例５：抗体－薬物コンジュゲート（４）

[0335]

［化57］



［0336］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１．６１ｍＬｍｇ$^{-1}$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５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。

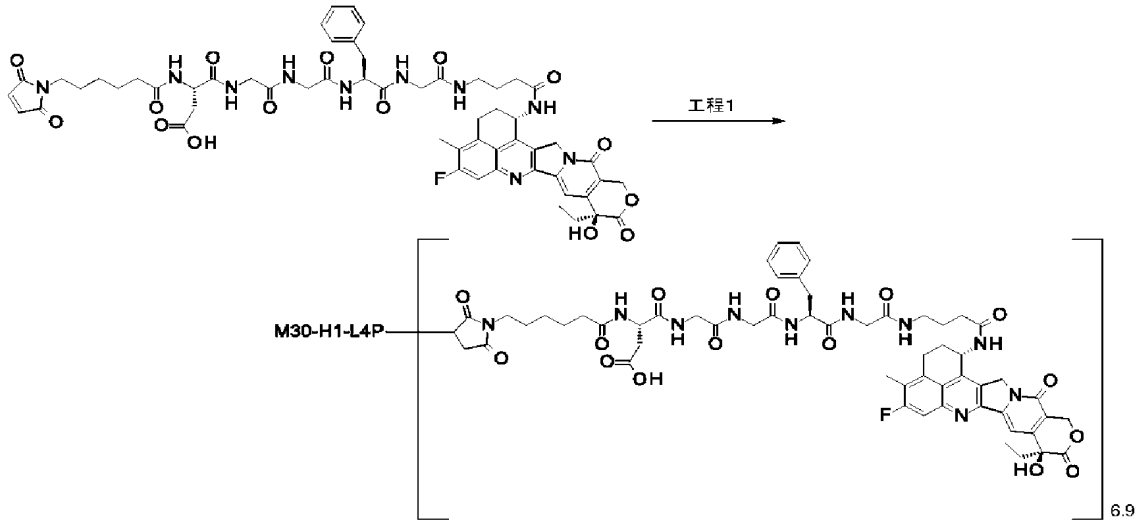
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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：１．４８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．８８ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．８

[0337] 実施例６：抗体－薬物コンジュゲート（５）

[0338] [化58]



[0339] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５）

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；０．０２５ｍＬ）と実施例２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（０．１２７ｍＬ；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、共通方法Ａを使用して、溶液を濃縮した

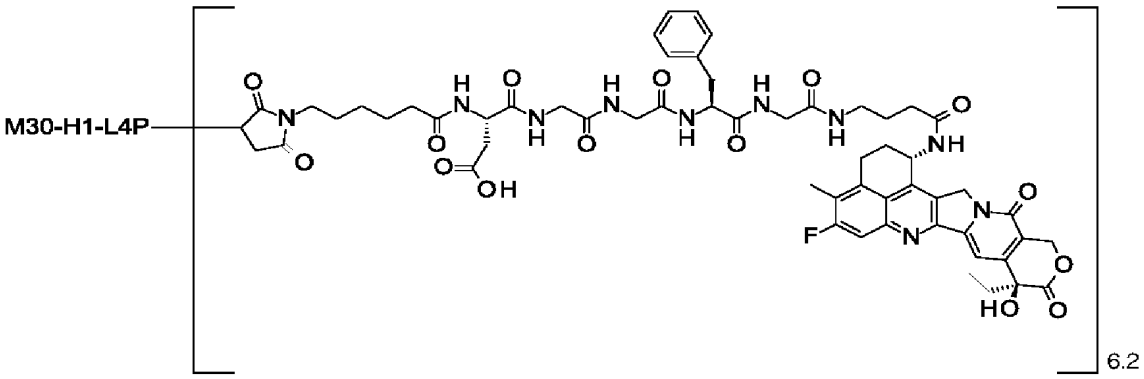
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．９４ｍｇ（４８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．９

[0340] 実施例７：抗体－薬物コンジュゲート（６）

[0341]

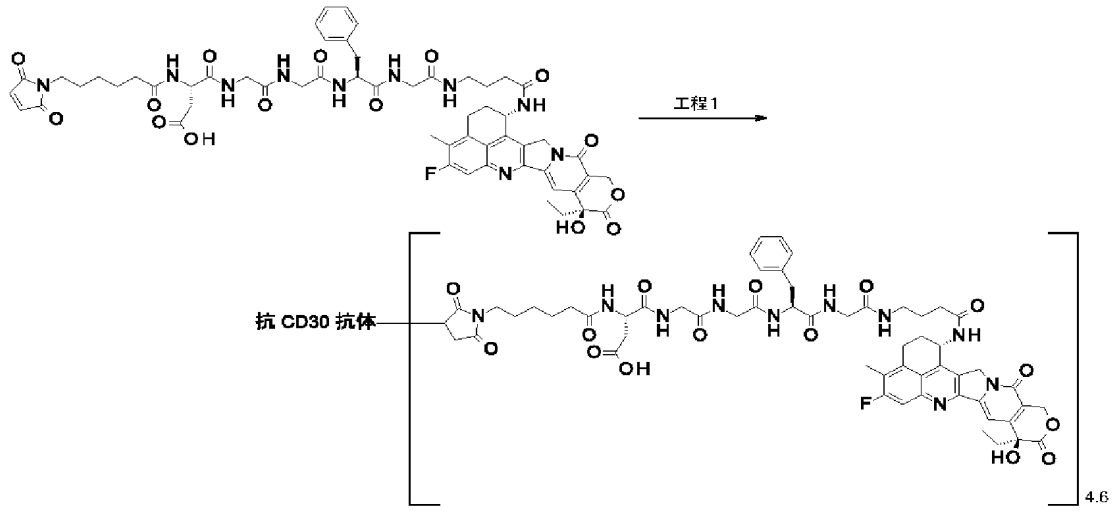
［化59］



［0342］　実施例５と実施例６の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、共通方法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：１４．３６ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２

［0343］実施例８：抗体－薬物コンジュゲート（７）

［0344］［化60］



［0345］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１．７５ｍＬｍｇ$^{-1}$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（１．０ｍＬ）を２ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣ

ＥＰ（東京化成工業株式会社）水溶液（０．０１４８ｍＬ；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り、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５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；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（０．００５９３ｍＬ；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。

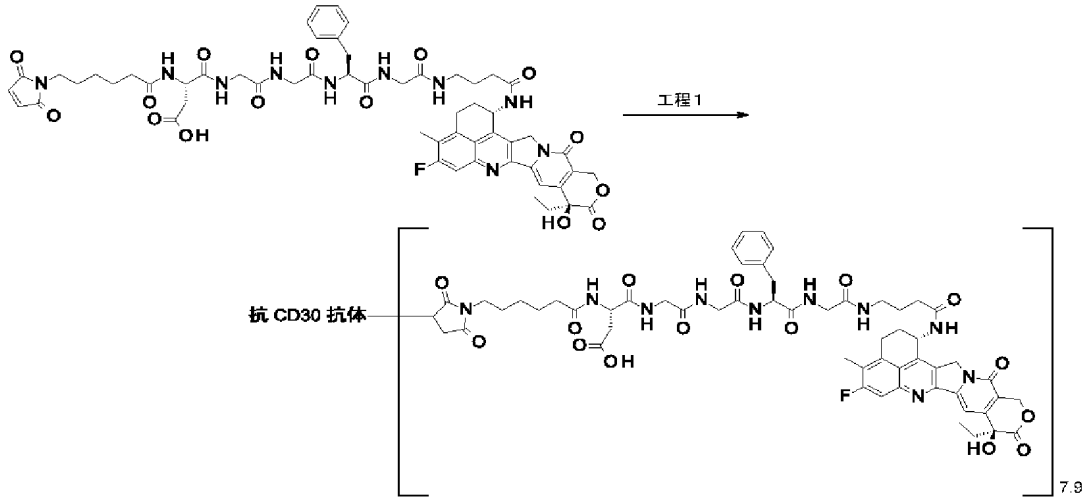
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．０８ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．６

[0346] 実施例９：抗体－薬物コンジュゲート（８）

[0347]

［化61］



［0348］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（８）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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５で得た化合物を１０ｍＭ含む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。

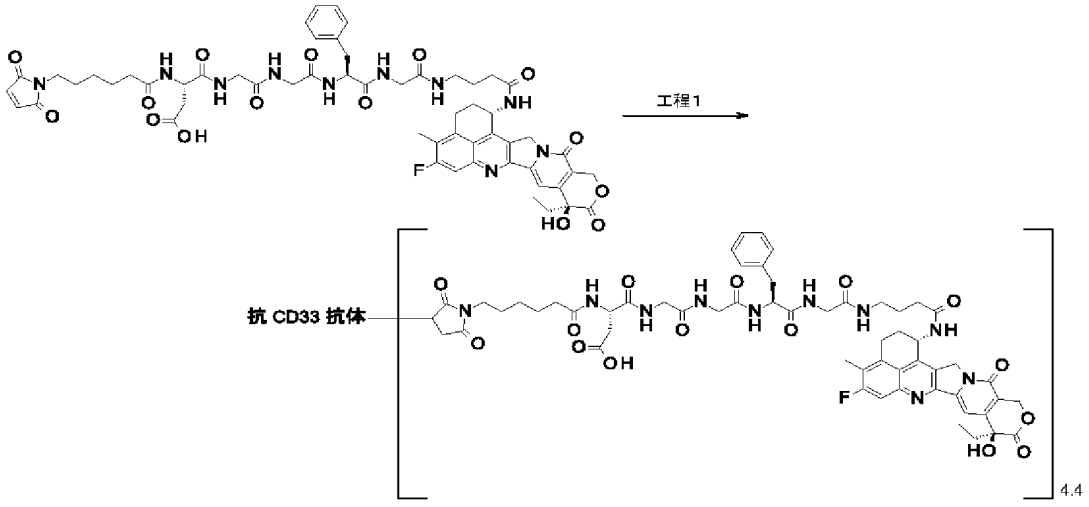
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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：１．０７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．４２ｍｇ（６４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．９

[0349] 実施例１０：抗体－薬物コンジュゲート（９）

[0350] [化62]



[0351] 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１．６６ｍＬｍｇ$^{-1}$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（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（０．０１４８ｍＬ；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り、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５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；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（０．００５９３ｍＬ；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。

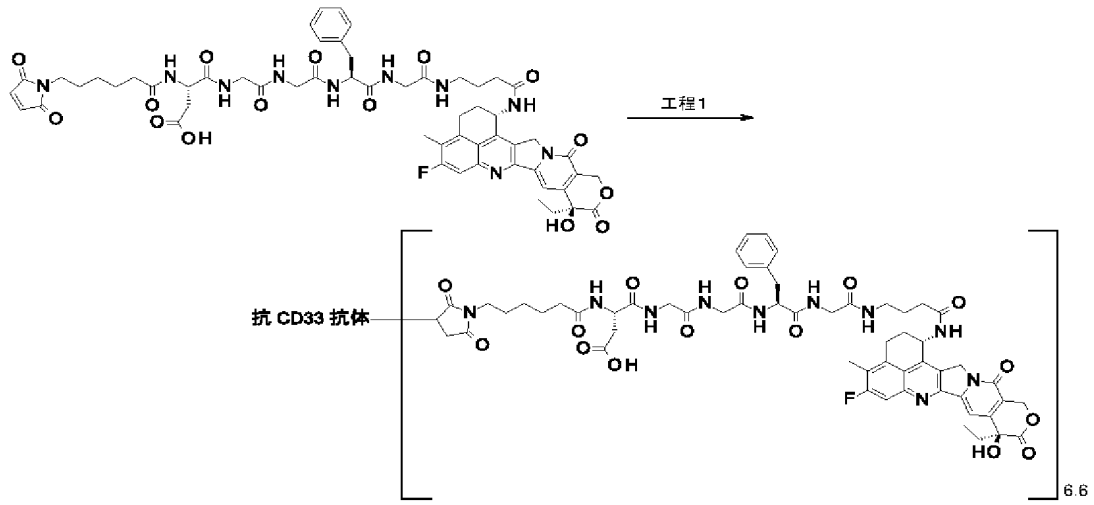
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．０９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．５４ｍｇ（６５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．４

[0352] 実施例１１：抗体－薬物コンジュゲート（１０）

[0353]

［化63］



［0354］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１０）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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５で得た化合物を１０ｍＭ含む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。

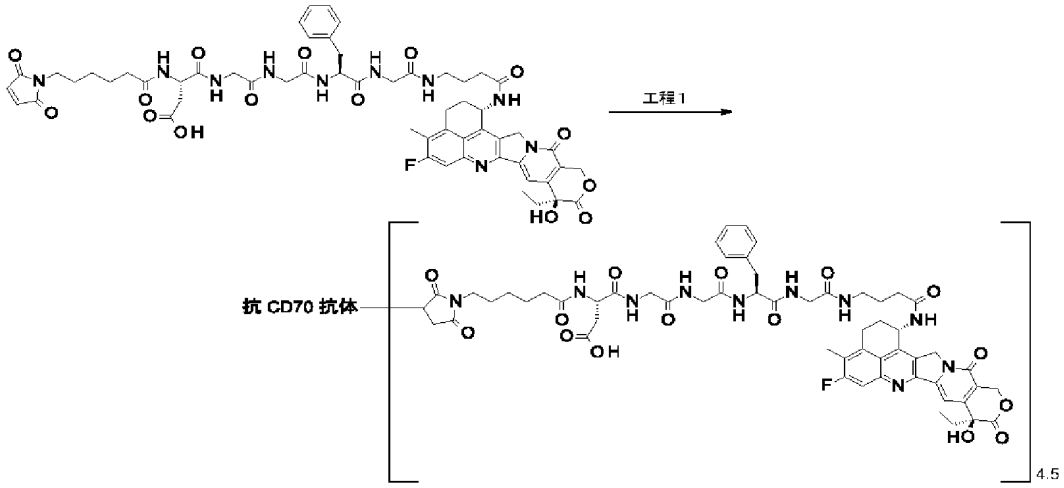
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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、$\varepsilon_{A,280}$＝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：１．０４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．２４ｍｇ（６２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．６

[0355] 実施例１２：抗体－薬物コンジュゲート（１１）

[0356] [化64]



[0357] 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１．６９ｍＬｍｇ$^{-1}$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（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（０．０１４８ｍＬ；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り、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５で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；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（０．００５９３ｍＬ；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。

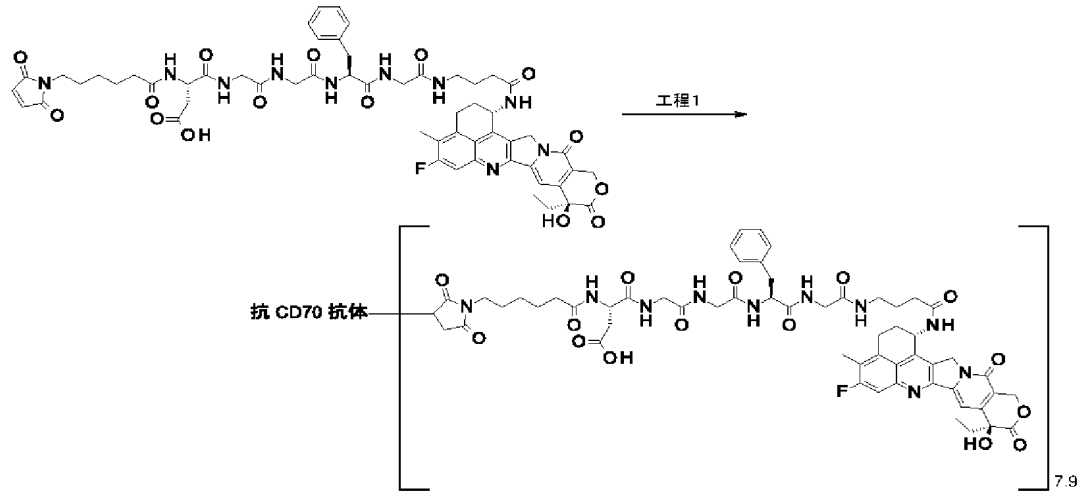
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２６２４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．１２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．７２ｍｇ（６７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．５

[0358] 実施例１３：抗体－薬物コンジュゲート（１２）

[0359]

［化65］



［0360］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１２）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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１の工程７で得た化合物を１０ｍＭ含む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。

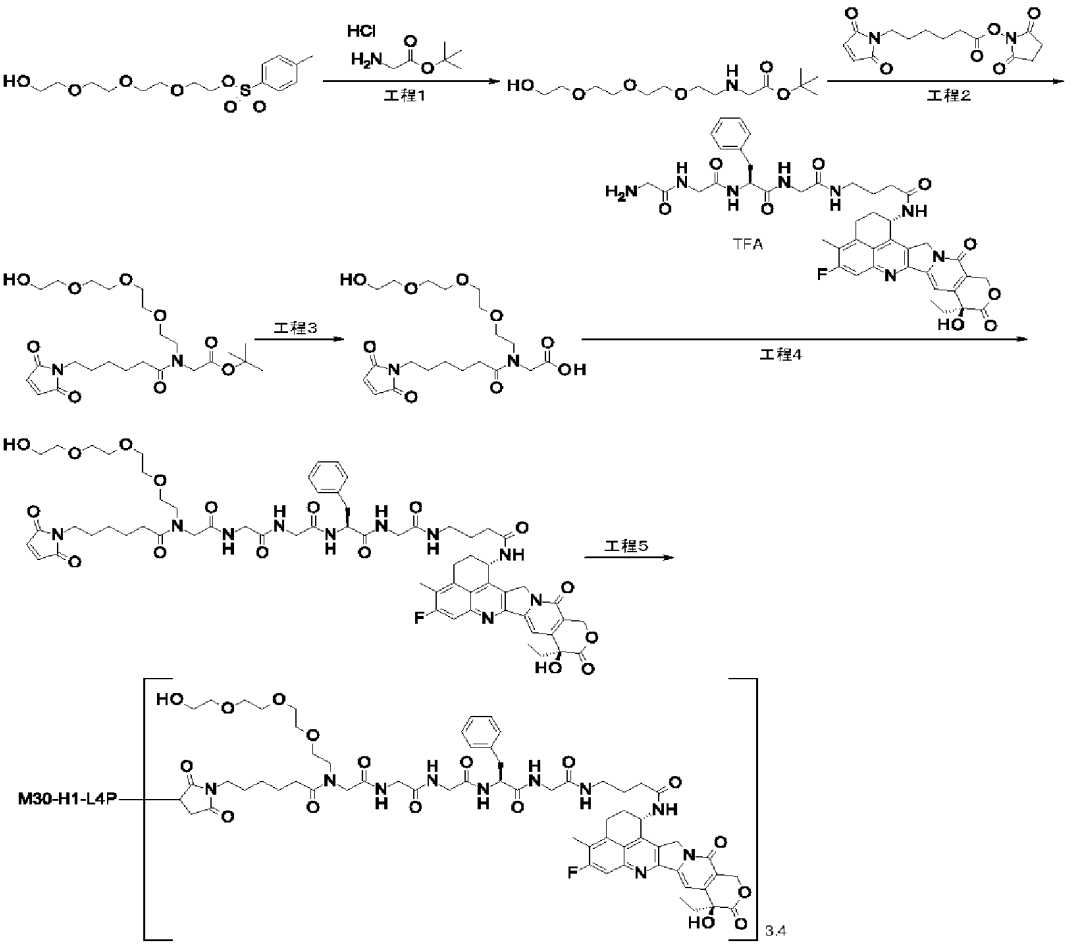
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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：１．０３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．１８ｍｇ（６２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．９

[0361] 実施例１４：抗体－薬物コンジュゲート（１３）

[0362] [化66]



[0363] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　Ｎ－（２－｛２－［２－（２－ヒドロキシエトキシ）エトキシ］エトキシ｝エチル）グリシネート

２－｛２－［２－（２－ヒドロキシエトキシ）エトキシ］エトキシ｝エチル４－メチルベンゼンスルホネート（Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，２０１１年，２１巻，５５０項；１．７５ｇ，５．００ｍｍｏＬ）、及びグリシンｔｅｒｔ－ブチル塩酸塩（１．２６ｇ，７．５２ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（１．９４ｇ，１５．０ｍｍｏＬ）を加え、６０℃で１０時間撹拌した。反応溶液にクロロホルムを加え、有機層を１規定塩酸で洗浄し、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＝８：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、無色油状の標記化合物（４２６ｍｇ，２８％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：１．４７（９Ｈ，ｓ），２．８０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．３Ｈｚ），３．３２（２Ｈ，ｓ），３．７６－３．５４（１７Ｈ，ｍ）．

[0364] 工程２：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］－Ｎ－（２－｛２－［２－（２－ヒドロキシエトキシ）エトキシ］エトキシ｝エチル）グリシネート

上記工程１で得た化合物（４２６ｍｇ，１．３９ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程４と同様に反応させ、無色油状の標記化合物（４８９ｍｇ，７０％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：１．２８－１．３６（２Ｈ，ｍ），１．４５（９Ｈ，ｓ），１．５７－１．７１（４Ｈ，ｍ），２．３９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），３．４８－３．７６（３Ｈ，ｍ），４．０２（２Ｈ，ｓ），６．６８（２Ｈ，ｓ）．

[0365] 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］－Ｎ－（２－｛２－［２－（２－ヒドロキシ

エトキシ）エトキシ］エトキシ｝エチル）グリシン

上記工程２で得た化合物（４８９ｍｇ，０．９７７ｍｍｏＬ）を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（２１１ｍｇ，４９％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：１．３８－１．２８（２Ｈ，ｍ），１．７３－１．５５（４Ｈ，ｍ），２．２８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），３．５０－３．７９（１８Ｈ，ｍ），４．１２（２Ｈ，ｓ），６．６８（２Ｈ，ｓ）．

[0366] 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］－Ｎ－（２－｛２－［２－（２－ヒドロキシエトキシ）エトキシ］エトキシ｝エチル）グリシ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３で得た化合物（４８．９ｍｇ，０．１１０ｍｍｏＬ）を、化合物（４）のメタンスルホン酸塩の代わりに実施例２の工程２で得た化合物（８４．０ｍｇ，０．１００ｍｍｏＬ）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（５４．０ｍｇ，４３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１４－１．２６（２Ｈ，ｍ），１．３９－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．６８－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７３－２．８４（１Ｈ，ｍ），２．９８－３．２１（５Ｈ，ｍ），３．２５－３．７９（２６Ｈ，ｍ），３．９３（２Ｈ，ｓ），４．４３－４．４９（１Ｈ，ｍ），４．５４－４．６１（１Ｈ，ｍ），５．２１（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．６Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６０（１Ｈ，ｍ），

６．５３（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１４－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６８－７．７４（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０２－８．３２（４Ｈ，ｍ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１２６５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0367] 工程５：抗体－薬物コンジュゲート（１３）

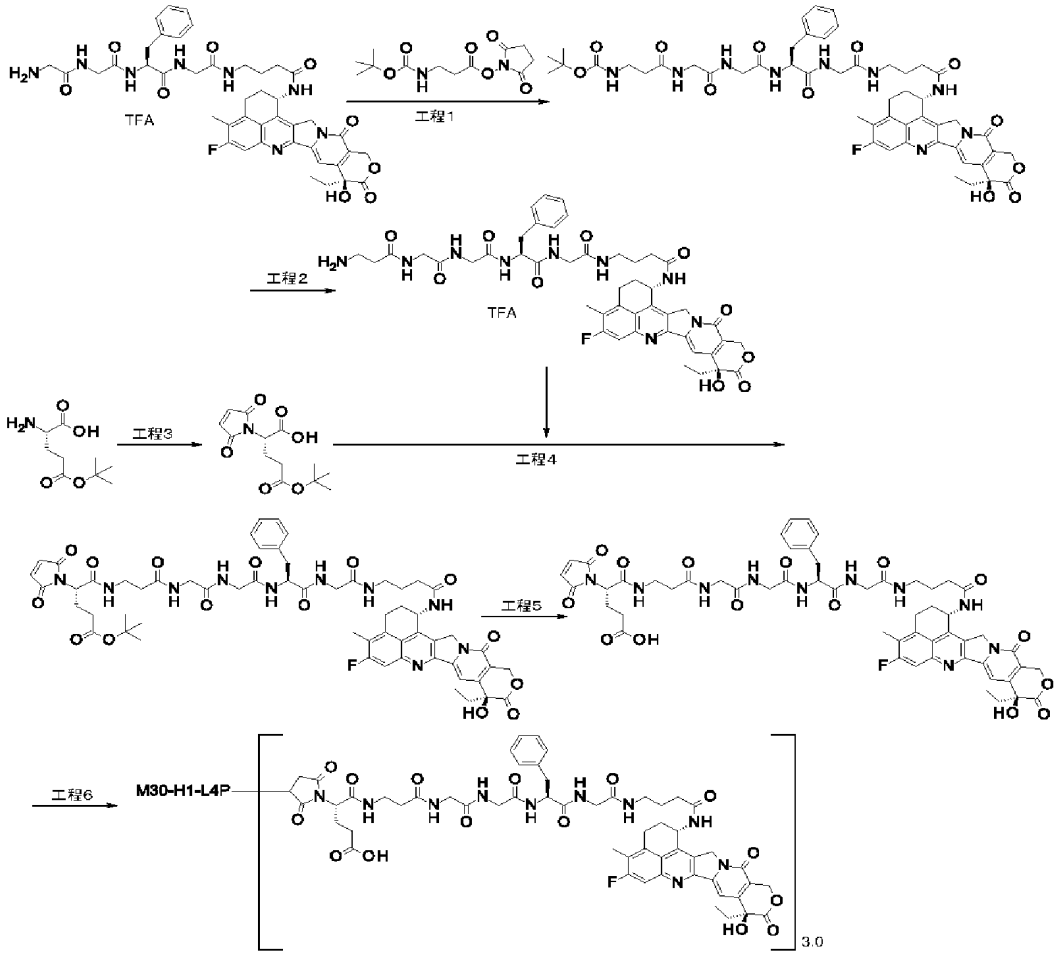
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程４で得た化合物を用いて、実施例２の工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１３．１３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．２ｍｇ（７４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４

[0368] 実施例１５：抗体－薬物コンジュゲート（１４）

[0369]

［化67］



［0370］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、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Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－β－アラニンを用いて実施例２の工程３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。

[0371] 工程２：βーアラニルグリシルグリシルーＬーフェニルアラニルーＮー（４ー｛［（１Ｓ，９Ｓ）ー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ーｂ］キノリンー１ーイル］アミノ｝ー４ーオキソブチル）グリシンアミド

上記工程１で得た粗生成物を、実施例１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）．

[0372] 工程３：（２Ｓ）ー５ーｔｅｒｔーブトキシー２ー（２，５ージオキソー２，５ージヒドローＩＨーピロールー１ーイル）ー５ーオキソペンタン酸

Ｌーグルタミン酸５ーｔｅｒｔーブチル（１．０２ｇ，５．００ｍｍｏＬ）を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（２０．０ｍＬ）に溶解し、０℃でＮーメトキシカルボニルマレイミド（０．７７５ｇ，５．００ｍｍｏＬ）を加え、０℃で３０分撹拌した後、室温で１時間撹拌した。反応溶液に０℃で５規定塩酸を加え、酸性とした後、酢酸エチルで抽出した。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、粗生成物を得た。得られた粗生成物を精製せずに次の工程に用いた。

[0373] 工程４：Ｎ－［（２Ｓ）－５－ｔｅｒｔ－ブトキシ－２－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－５－オキソペンタノイル］－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

上記工程３で得た粗生成物（８５．０ｍｇ，０．３００ｍｍｏＬ）を、化合物（４）のメタンスルホン酸塩の代わりに上記工程２で得た化合物（１８２ｍｇ，０．２００ｍｍｏＬ）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（１０２ｍｇ，４３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．６７－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．３５－２．０５（１０Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７５－２．８３（１Ｈ，ｍ），２．９９－３．１３（３Ｈ，ｍ），３．１４－３．２６（４Ｈ，ｍ），３．５５－３．７６（６Ｈ，ｍ），４．３６－４．５０（２Ｈ，ｍ），５．２１（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．０３（２Ｈ，ｓ），７．１７－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６８－７．７３（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），８．００－８．０５（２Ｈ，ｍ），８．１２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１６－８．２０（１Ｈ，ｍ），８．２３－８．２８（１Ｈ，ｍ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

[0374] 工程５：Ｎ－［（２Ｓ）－４－カルボキシ－２－（２，５－ジオキソ－２，

５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ブタノイル］－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

上記工程４で得た化合物（１０２ｍｇ，８６．８μｍｏＬ）を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（７６．０ｍｇ，７８％）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），１．６８－１．７５（２Ｈ，ｍ），１．８４－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．３５－２．０５（１０Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７４－２．８３（１Ｈ，ｍ），２．９９－３．１２（３Ｈ，ｍ），３．１４－３．２６（４Ｈ，ｍ），３．５５－３．７７（６Ｈ，ｍ），４．４１－４．４９（２Ｈ，ｍ），５．２１（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝３８．７，１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．０３（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６９－７．７４（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０１－８．０７（２Ｈ，ｍ），８．１２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．１９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），１２．１２（１Ｈ，ｓ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１１９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0375] 工程６：抗体－薬物コンジュゲート（１４）

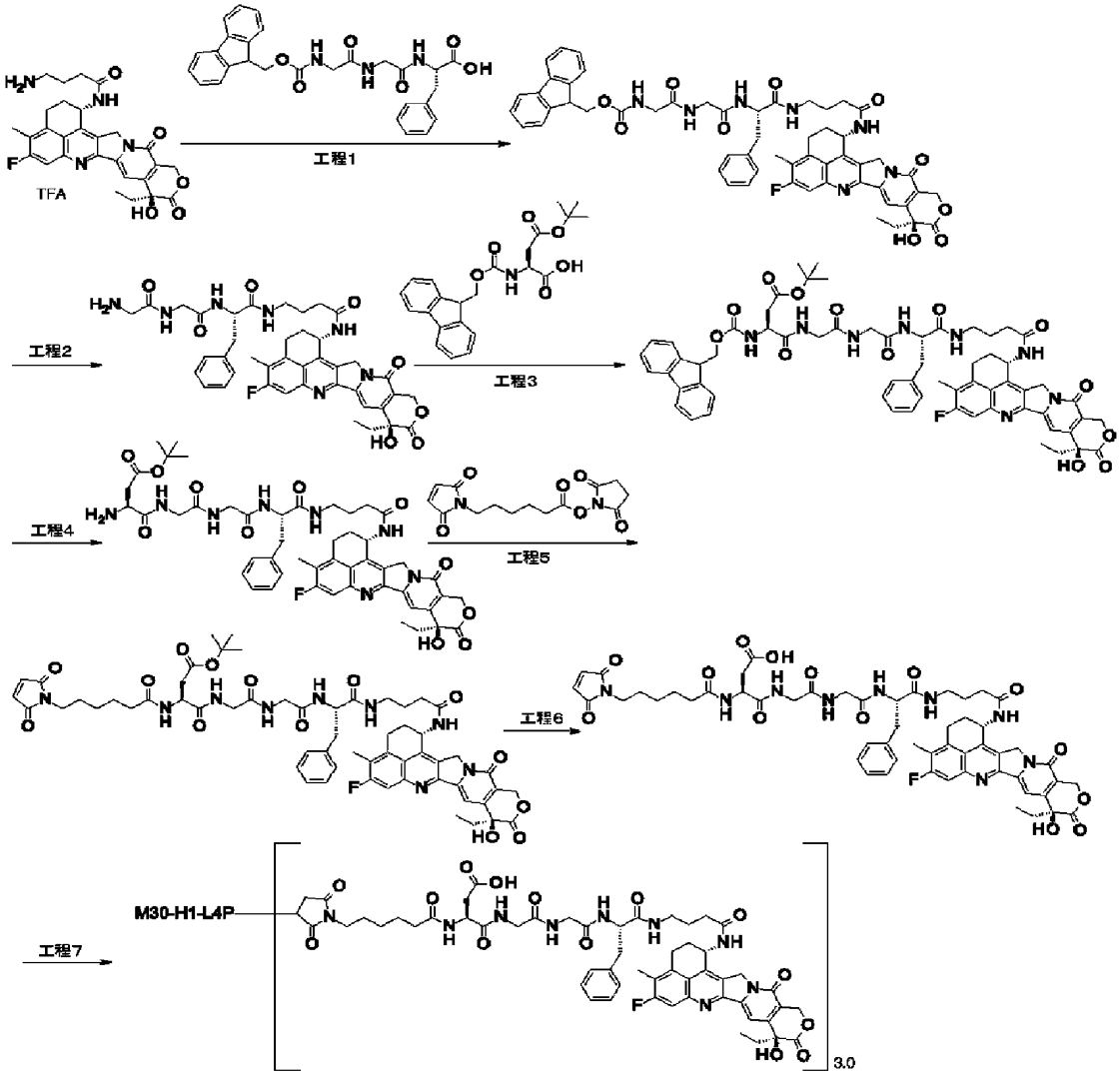
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程５で得た化合物を用いて、実施例２の工程６と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１２．７７ｍｇ／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）：３．０

[0376] 実施例１６：抗体－薬物コンジュゲート（１５）

[0377] [化68]



[0378] 工程１：Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシル－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－フェニルアラニンアミド

実施例１の工程２で得た化合物（３００ｍｇ，０．４７３ｍｍｏＬ）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－［（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－フェニルアラニン（特開２００２－６０３５１号公報に記載された化合物；３４６ｍｇ，０．６９１ｍｍｏＬ）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（２３０ｍｇ，４０％）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），１．６７－１．６８（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．８４（２Ｈ，ｍ），２．１３（４Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝１１．４Ｈｚ），２．９６－３．０８（４Ｈ，ｍ），３．１６－３．１７（２Ｈ，ｍ），３．５９－３．７４（４Ｈ，ｍ），４．２２－４．２８（２Ｈ，ｍ），４．３９－４．４２（１Ｈ，ｍ），５．１６－５．２２（２Ｈ，ｍ），５．３６－５．４１（２Ｈ，ｍ），５．５６－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），７．１４－７．２０（５Ｈ，ｍ），７．２９－７．３１（３Ｈ，ｍ），７．３８－７．４１（２Ｈ，ｍ），７．６１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），７．６９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），７．９５（１Ｈ，ｓ），８．０７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝４．３Ｈｚ），８．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１００４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0379] 工程２：グリシルグリシル－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－フェニルアラニンアミド

上記工程１で得た化合物（２２６ｍｇ，０．２２５ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．２２３ｍＬ，２．２５ｍｍｏＬ）を加え、室温で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。

[0380] 工程３：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－１２－ベンジル－１８－｛［（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－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－４，７，１０，１３，１８－ペンタオキソ－５，８，１１，１４－テトラアザオクタデカン－１－オエート

上記工程２で得た化合物（０．２２５ｍｍｏＬ）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－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－アスパラギン酸４－ｔｅｒｔ－ブチル（１０４ｍｇ，０．３３７ｍｍｏＬ）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（１１４ｍｇ，４３％）を淡黄色固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．６６－１．６９（２Ｈ，ｍ），１．８４－１．８５（２Ｈ，ｍ），２．１１－２．１３（４Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．４３－２．４５（１Ｈ，ｍ），２．６８－２．７９（２Ｈ，ｍ），２．９４－３．１６（５Ｈ，ｍ），３．６６（５Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝３０．５，１０．０Ｈｚ），４．２３－４．３０（３Ｈ，ｍ），４．３９－４．４１（１Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．５３－５．５７（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．２２（５Ｈ，ｍ），７．２６－７．３４（３Ｈ，ｍ），７．３８－７．４０（２Ｈ，ｍ），７．６８－７．７０（２Ｈ，ｍ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．８６－７．８７（２Ｈ，ｍ），７．８８－７．９０（１Ｈ，ｍ），７

．９６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），８．０３－８．０７（２Ｈ，ｍ），８．２０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１１７５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0381] 工程４：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－３－アミノ－１２－ベンジル－１８－｛［（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｝－４，７，１０，１３，１８－ペンタオキソ－５，８，１１，１４－テトラアザオクタデカン－１－オエート

上記工程３で得た化合物（１１０ｍｇ，０．０９３６ｍｍｏＬ）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。

[0382] 工程５：ｔｅｒｔ－ブチル　（３Ｓ，１２Ｓ）－１２－ベンジル－３－｛［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］アミノ｝－１８－｛［（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｝－４，７，１０，１３，１８－ペンタオキソ－５，８，１１，１４－テトラアザオクタデカン－１－オエート

上記工程４で得た化合物（０．０９３６ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程４と同様に反応させ、標記化合物（４０．２ｍｇ，３８％）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），１．１７－１．１９（２Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．４４－１．４７（４Ｈ，ｍ），１．６６－１．６７（２Ｈ，ｍ），１

．８１－１．８８（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．１３（６Ｈ，ｍ），２．３９－２．４１（１Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．６７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．０，５．５Ｈｚ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．３，９．０Ｈｚ），２．９６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．５，４．９Ｈｚ），３．０４（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１３．４，６．６Ｈｚ），３．１８（２Ｈ，ｓ），３．３６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），３．５８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．８，５．５Ｈｚ），３．７０（３Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝２１．５，７．２Ｈｚ），４．３８－４．４１（１Ｈ，ｍ），４．５７－４．５９（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．３８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．４Ｈｚ），５．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．５７－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２５（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９４－８．０４（３Ｈ，ｍ），８．１３－８．１６（２Ｈ，ｍ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１１４６（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0383] 工程６：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－α－アスパラチルグリシルグリシル－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－フェニルアラニンアミド

上記工程５で得た化合物（４０．０ｍｇ，０．０３４９ｍｍｏＬ）を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（３３．６ｇ，８８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１４－１．２０（２Ｈ，ｍ），１．４６（４Ｈ，ｔｄ

，Ｊ＝１４．８，７．３Ｈｚ），１．６７（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１２．９，６．３Ｈｚ），１．８４（２Ｈ，ｄｑ，Ｊ＝２５．５，７．２Ｈｚ），２．１１（６Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝２３．４，７．３Ｈｚ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．４５－２．４７（１Ｈ，ｍ），２．６９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．５，５．５Ｈｚ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．３Ｈｚ），２．９４－３．０１（１Ｈ，ｍ），３．０５（２Ｈ，ｄｑ，Ｊ＝２５．１，６．４Ｈｚ），３．１７－３．１９（１Ｈ，ｍ），３．３４－３．４６（４Ｈ，ｍ），３．５９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．６，５．６Ｈｚ），３．６９（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝２０．１，６．８Ｈｚ），４．３７－４．４１（１Ｈ，ｍ），４．５５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．５，７．７Ｈｚ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．０Ｈｚ），５．２２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．６Ｈｚ），５．３８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．４Ｈｚ），５．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．４Ｈｚ），５．５５－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１９（５Ｈ，ｄｑ，Ｊ＝３１．６，７．９Ｈｚ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９９（３Ｈ，ｄｄｄ，Ｊ＝２５．１，１４．２，６．２Ｈｚ），８．１１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ），１２．３２（１Ｈ，ｓ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０９０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0384] 工程７：抗体－薬物コンジュゲート（１５）

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（２８０　ｎｍ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）０．１０２ｍＬと上記工程６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０．００９ｍＬ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、共通方法Ａを使用して、溶液を濃縮した。

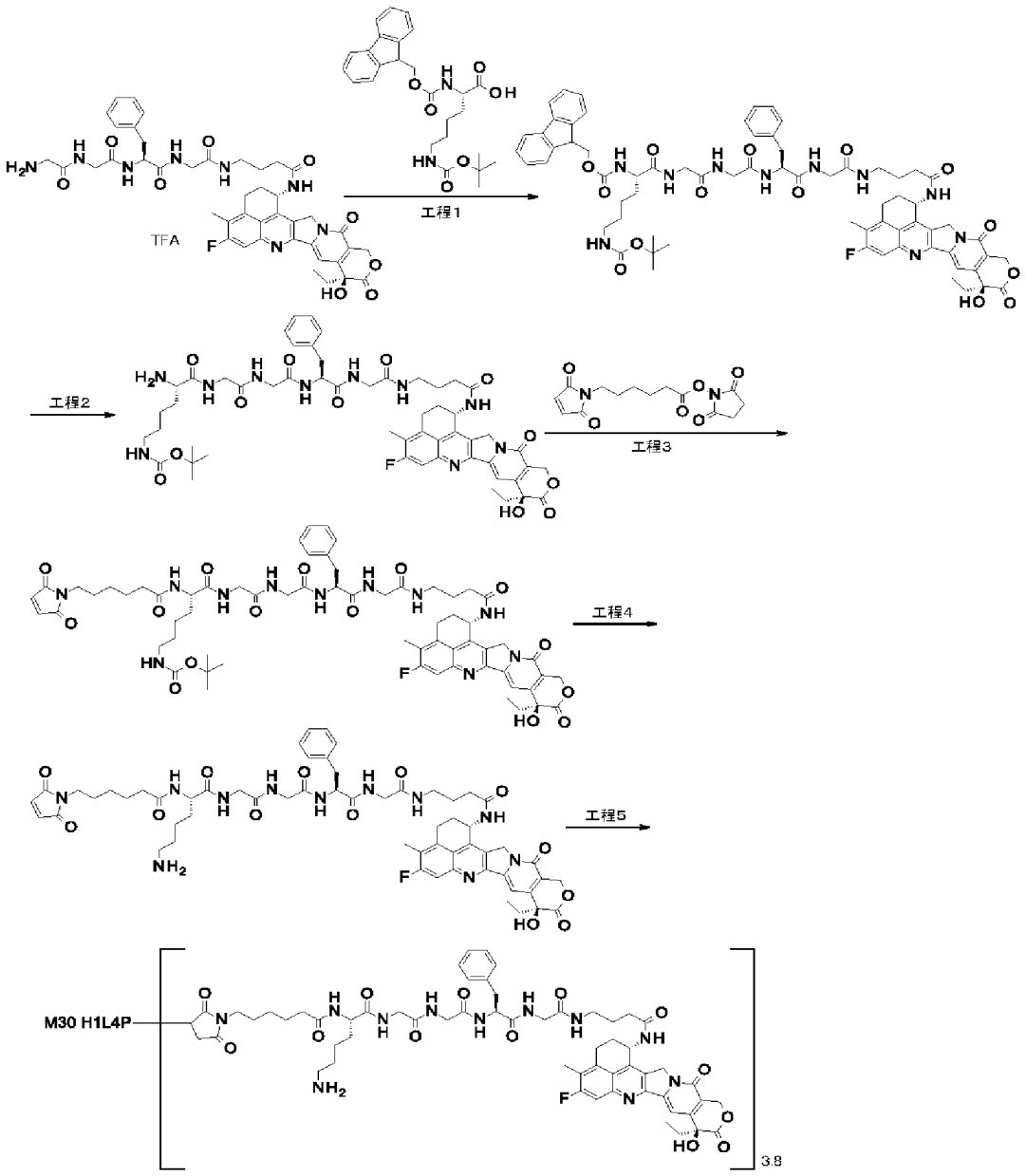
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：９．１６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．４ｍｇ（５１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０

[0385] 実施例１７：抗体－薬物コンジュゲート（１６）

[0386]

［化69］



［0387］工程１：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（１６７ｍｇ，０．１７６ｍｍｏＬ）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$^{\varepsilon}$－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｎ$^{\alpha}$－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン（１０３ｍｇ，０．２２ｍｍｏＬ）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。

[0388] 工程２：Ｎ^{6}－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－Ｌ－リジ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で得た粗生成物のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．４００ｍＬ）を加え、室温で２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（１１３ｍｇ，６０％）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），１．１８－１．４９（５Ｈ，ｍ），１．３６（９Ｈ，ｓ），１．５１－１．６０（１Ｈ，ｍ），１．６７－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０９－２．２０（４Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７６－２．８９（３Ｈ，ｍ），２．９９－３．２２（６Ｈ，ｍ），３．５８－３．７７（６Ｈ，ｍ），４．４３－４．４９（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．５Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．７６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．１５－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（

１Ｈ，ｓ），７．６９－７．７４（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２２－８．３０（２Ｈ，ｍ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

[0389] 工程３：N^6－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－N^2－［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－リジ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（１１３ｍｇ，０．１０６ｍｍｏＬ）を、実施例２の工程４と同様に反応させ、標記化合物（１０２ｍｇ，６１％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１１－１．５３（１１Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．５６－１．６５（１Ｈ，ｍ），１．６８－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２０（６Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７４－２．９０（３Ｈ，ｍ），２．９６－３．３９（７Ｈ，ｍ），３．５７－３．７４（６Ｈ，ｍ），４．１４－４．２１（１Ｈ，ｍ），４．４２－４．４９（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．７２－６．７８（１Ｈ，ｍ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６９－７．７２（１Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．９９－８．０４（１Ｈ，ｍ），８．１０－８．１８（２Ｈ，ｍ），８．２６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ）

，８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

[0390] 工程４：Ｎ^{2}－［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－リジ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３で得た化合物（１０２ｍｇ，８０．９μｍｏＬ）のジクロロメタン（４．００ｍＬ）、トリフルオロ酢酸（１．００ｍＬ）を加え、室温にて２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（５７．０ｍｇ，６１％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１２－１．３５（４Ｈ，ｍ），１．４１－１．５５（７Ｈ，ｍ），１．６１－１．７７（３Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．２２（６Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．８４－２．７１（３Ｈ，ｍ），２．９７－３．４０（７Ｈ，ｍ），３．５９－３．７６（６Ｈ，ｍ），４．２０－４．２５（１Ｈ，ｍ），４．４５－４．５０（１Ｈ，ｍ），５．２０（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝１８．５Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０１（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．０５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），８．１３－８．１８（２Ｈ，ｍ），８．２８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１６０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

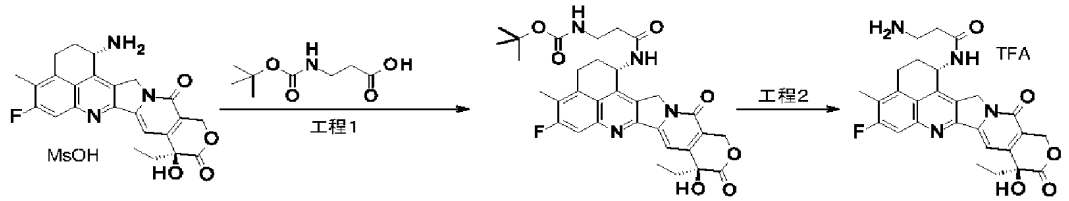
[0391] 工程５：抗体－薬物コンジュゲート（１６）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程４で得た化合物を用いて、実施例１６の工程７と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１９．２６ｍｇ／ｍＬ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．８

[0392] 実施例１８　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] [化70]



[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）．

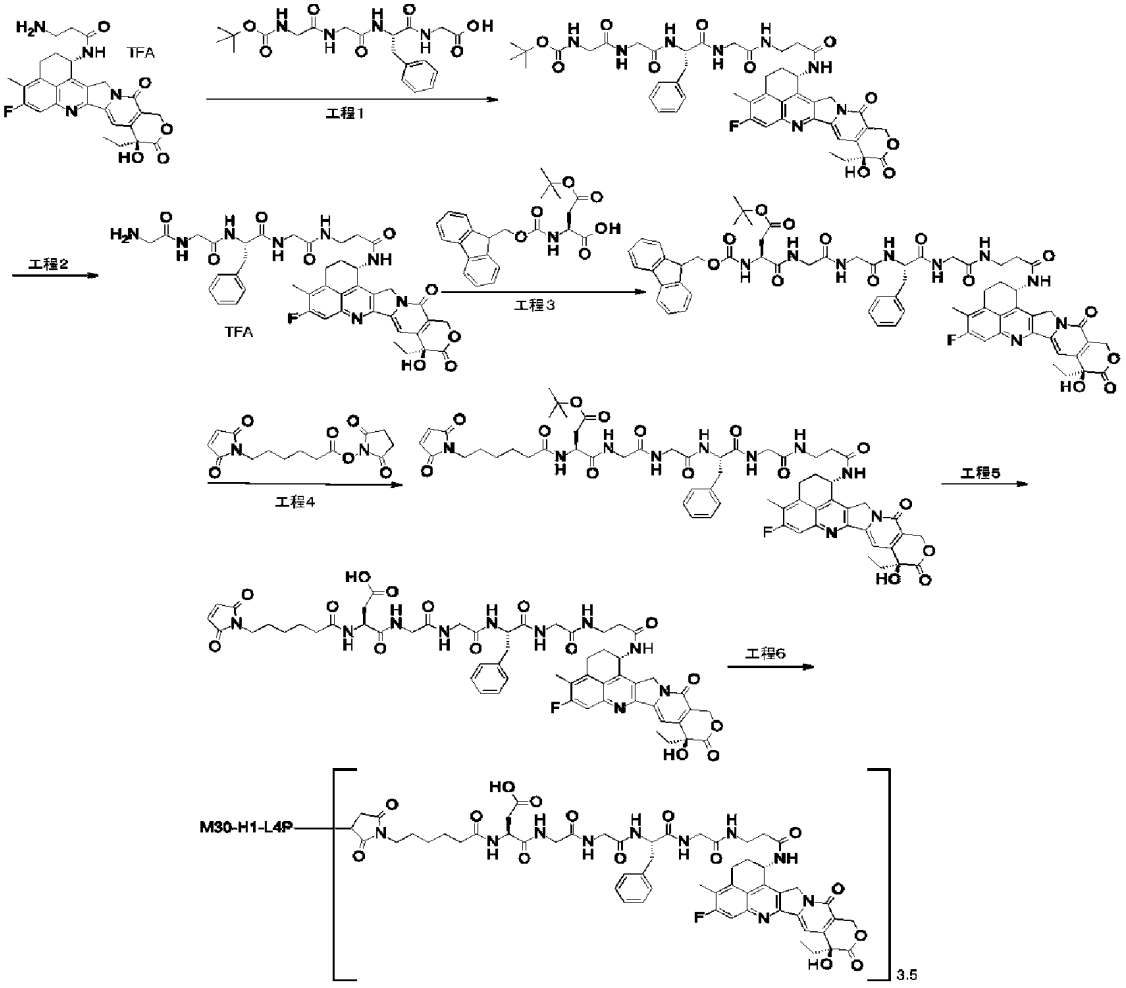
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５０７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0396] 実施例１９：抗体－薬物コンジュゲート（１７）

[0397]

OnCusp
Ex. 1038

［化71］



［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１８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，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：グリシルグリシルーＬーフェニルアラニルグリシルーＮー［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチルー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，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，ｂｒ．ｓ．），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：ｔｅｒｔ－ブチル　（９Ｓ，１８Ｓ）－９－ベンジル－１－｛［（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｝－１８－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－１，５，８，１１，１４，１７－ヘキサオキソ－４，７，１０，１３，１６－ペンタアザイコサン－２０－ノエート

上記工程２で得た化合物（１５０ｍｇ，０．１８２ｍｍｏＬ）を、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の代わりに（２Ｓ）－４－ｔｅｒｔ－ブトキシ－２－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－４－オキソブタン酸（９０．０ｍｇ，０．２１９ｍｍｏＬ）を用いて、実施例２の工程１と同様に反応させ、標記化合物（８４．０ｍｇ，３８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８２－０．９１（３Ｈ，ｍ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．８５（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．０，７．３Ｈｚ），２．０６－２．２１（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），

OnCusp
Ex. 1038

２．３１－２．５３（５Ｈ，ｍ），２．６４－２．７３（１Ｈ，ｍ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１１－３．２０（２Ｈ，ｍ），３．５５－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．１７－４．３５（３Ｈ，ｍ），４．３５－４．４３（１Ｈ，ｍ），４．４４－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４１（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１８．８，１６．４Ｈｚ），５．５１－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．１３－７．２０（１Ｈ，ｍ），７．２０－７．２７（４Ｈ，ｍ），７．２７－７．３４（３Ｈ，ｍ），７．３９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），７．６５－７．７３（３Ｈ，ｍ），７．７９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），７．８７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．００（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），８．０８－８．２０（２Ｈ，ｍ），８．２２－８．３１（１Ｈ，ｍ），８．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１２１８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0401] 工程４：ｔｅｒｔ－ブチル　（９Ｓ，１８Ｓ）－９－ベンジル－１８－｛［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］アミノ｝－１－｛［（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｝－１，５，８，１１，１４，１７－ヘキサオキソ－４，７，１０，１３，１６－ペンタアザイコサン－２０－ノエート

上記工程３で得た化合物（８１．０ｍｇ，０．０６６５ｍｍｏＬ）を実施例２の工程４と同様に反応させ、標記化合物（５６．０ｍｇ，７１％）を得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１８９．５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0402] 工程５：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロー

ルー１ーイル）ヘキサノイル］ーＬーαーアスパラチルグリシルグリシルーＬーフェニルアラニルグリシルーＮー［（１Ｓ，９Ｓ）ー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ーｂ］キノリンー１ーイル］ーβーアラニンアミド

上記工程４で得た化合物（５２．０ｍｇ，０．０４３７ｍｍｏＬ）を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（３５．０ｍｇ，７１％）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），１．１２－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．３９－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．７８－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０４－２．１９（２Ｈ，ｍ），２．０８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．３１－２．４６（６Ｈ，ｍ），２．６１－２．７２（１Ｈ，ｍ），２．７３－２．８５（１Ｈ，ｍ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，４．７Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｍ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），３．２６－３．４３（２Ｈ，ｍ），３．５５－３．７７（６Ｈ，ｍ），４．４２－４．５０（１Ｈ，ｍ），４．５１－４．５８（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５２－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９３－８．０２（１Ｈ，ｍ），８．０３－８．１７（３Ｈ，ｍ），８．２２－８．３１（１Ｈ，ｍ），８．５３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１３３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0403] 工程６：抗体ー薬物コンジュゲート（１７）

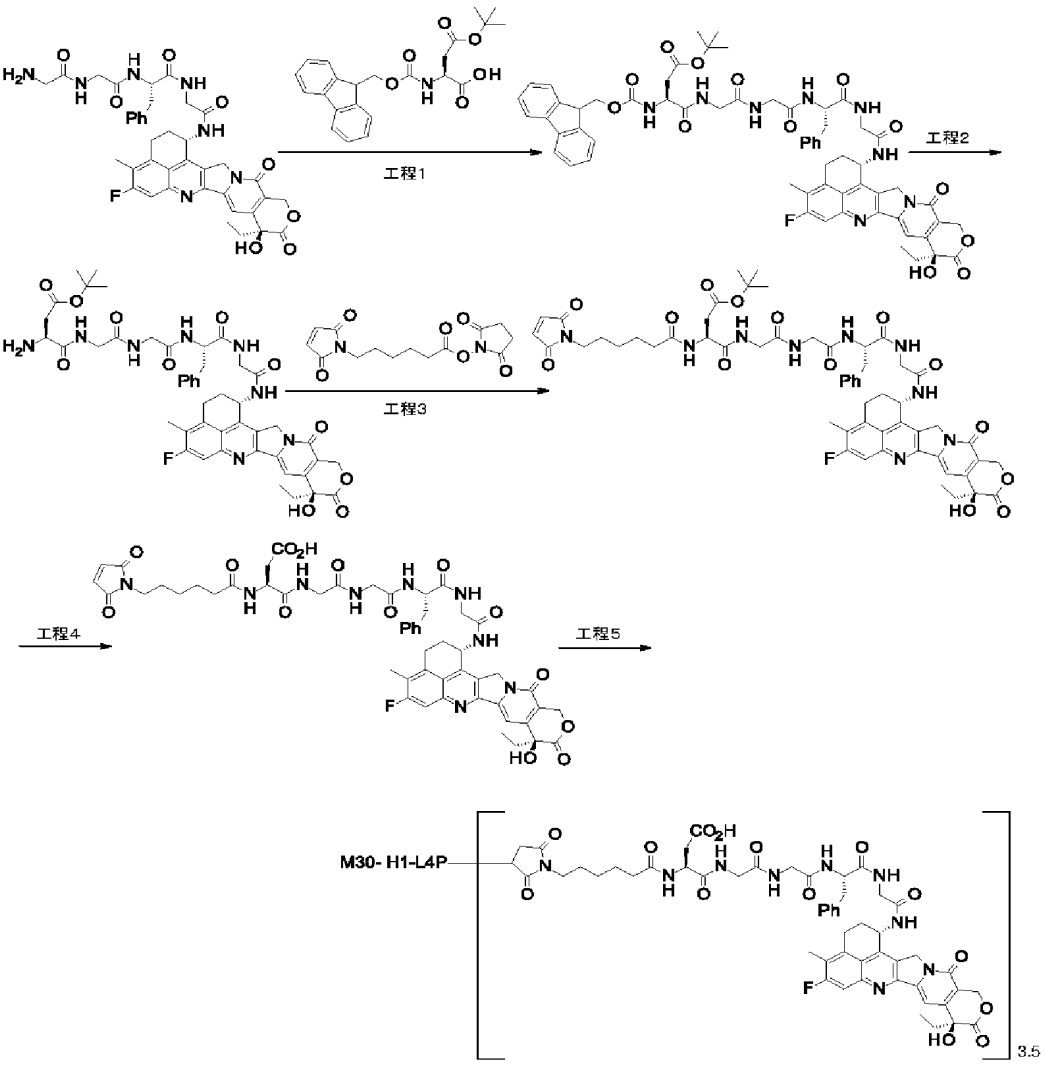
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程５で得た化合物を用いて、実施例４の工程１と同様の方法により、標記抗体ー薬物コン

ジュゲートを得た。

抗体濃度：９．５６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．７ｍｇ（５４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．５

[0404] 実施例２０：抗体－薬物コンジュゲート（１８）

[0405] [化72]



[0406] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｓ，１４Ｓ）－５－ベンジル－１－｛［（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｝－１４－｛［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］アミノ｝－１，４，７，１０，１３－ペンタオキソ－３，６，９，１２－テトラアザヘキサデカン－１６－オエート

氷冷下、グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－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］グリシンアミド（ＷＯ９７／４６２６０に記載された医薬化合物のフリー体；０．２５０ｇ，０．３３２ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（５７．２ｍｇ，０．４９７ｍｍｏＬ）、及びＮ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］－Ｌ－アスパラギン酸４－ｔｅｒｔ－ブチル（０．２０５ｇ，０．４９７ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１２３ｇ，０．４９７ｍｍｏＬ）を加え、室温にて２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（０．２７８ｇ，７３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．７９－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０３－２．２５（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．４０－２．５１（２Ｈ，ｍ），２．６４－２．８２（２Ｈ，ｍ），２．９８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．６Ｈｚ），３．１６（２Ｈ，ｂｒｓ），３．５５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．７，５．７Ｈｚ），３．６３－３．８０（４Ｈ，ｍ），４．１６－４．３４（３Ｈ，ｍ），４．３６－４．５０（２Ｈ，ｍ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．３７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．５１－５．６２（１Ｈ，ｍ），

６．５２（１Ｈ，ｓ），７．１０－７．２５（５Ｈ，ｍ），７．２６－７．３３（３Ｈ，ｍ），７．３９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．６５－７．７２（３Ｈ，ｍ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．９８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．０７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．３１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１４７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0407] 工程２：ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｓ，１４Ｓ）－１４－アミノ－５－ベンジル－１－｛［（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｝－１，４，７，１０，１３－ペンタオキソ－３，６，９，１２－テトラアザヘキサデカン－１６－オエート

上記工程１で得た化合物（０．２７９ｇ，０．２４２ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．２４０ｍＬ，２．４２ｍｍｏＬ）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＝２：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２６５ｇ，定量的）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３９（９Ｈ，ｓ），１．８１－１．９４（１Ｈ，ｍ），２．０７－２．２８（２Ｈ，ｍ），２．３７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１５．８，８．０Ｈｚ），２．４３（３Ｈ，ｓ），２．６０（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１５．８，４．９Ｈｚ），２．７５－２．８２（１Ｈ，ｍ），３．００（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１６－３．２５（２Ｈ，ｍ），３．５０－３．６１（２Ｈ，ｍ），３．６５－３．８１（５Ｈ，ｍ），４．４

０－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．２７（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２４．１，１９．０Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１．３，１６．２Ｈｚ），５．５６－５．６５（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１５－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．２６－８．３９（２Ｈ，ｍ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

[0408] 工程３：ｔｅｒｔ－ブチル　（５Ｓ，１４Ｓ）－５－ベンジル－１４－｛［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］アミノ｝－１－｛［（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｝－１，４，７，１０，１３－ペンタオキソ－３，６，９，１２－テトラアザヘキサデカン－１６－オエート

上記工程２で得た化合物（０．１００ｇ，０．１０８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２．００ｍＬ）溶液に、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（４０．０ｍｇ，０．１３０ｍｍｏＬ）を加え、室温で２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（８０．０ｍｇ，６６％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１３－１．２３（２Ｈ，ｍ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．４２－１．５４（４Ｈ，ｍ），１．８０－１．９６（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２５（４Ｈ，ｍ），２．３５－３．７６（１５Ｈ，ｍ），２．４３（３Ｈ，ｓ），４．３９－４．４９（１Ｈ，ｍ），４．５５－４．６７（１Ｈ，ｍ），５．２１－５．３４（２Ｈ，ｍ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，

Ｊ＝２１．１，１６．４Ｈｚ），５．５６－５．６４（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝０．８Ｈｚ），７．１６－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．３Ｈｚ），８．０４－８．１８（３Ｈ，ｍ），８．３０－８．３７（１Ｈ，ｍ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１１８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0409] 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］－Ｌ－α－アスパルチルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－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］グリシンアミド

氷冷下、上記工程３で得た化合物（７０．０ｍｇ，６２．６μｍｏＬ）にトリフルオロ酢酸（４．００ｍＬ）を加え、室温にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物（５５．０ｍｇ，８３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．１４－１．２４（２Ｈ，ｍ），１．４１－１．５３（４Ｈ，ｍ），１．７９－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０８－２．２８（４Ｈ，ｍ），２．３７－２．６０（２Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．６３－２．８２（２Ｈ，ｍ），２．９９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，５．１Ｈｚ），３．１２－３．２５（２Ｈ，ｍ），３．２９－３．４４（１Ｈ，ｍ），３．５２－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．３８－４．４８（１Ｈ，ｍ），４．５６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，７．４Ｈｚ），５．２７（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２４．３，１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１．５，１６．４Ｈｚ），５．５７－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０１（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３３（

１Ｈ，ｓ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９８（１Ｈ，ｂｒｓ），８．０８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．３４（１Ｈ，ｂｒｓ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），１２．２６（１Ｈ，ｂｒｓ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0410] 工程５：抗体－薬物コンジュゲート（１８）

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（８．０ｍＬ）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（０．１２４ｍＬ；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．；０．４００ｍＬ）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り、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４で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．２４９ｍＬ；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（０．０５０ｍＬ；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。

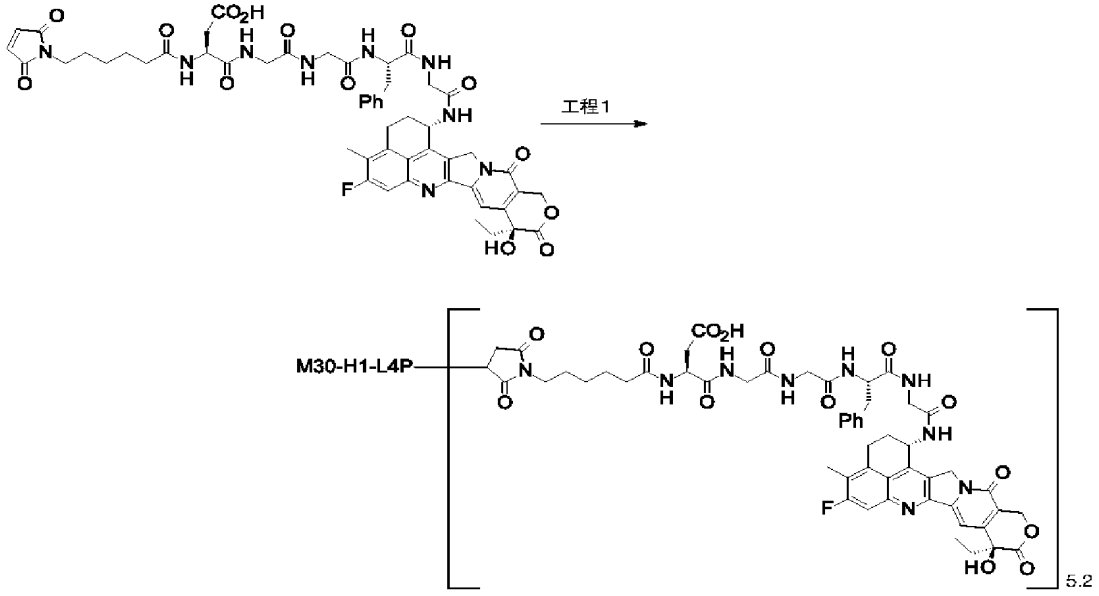
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,2}$

$_{80}$＝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：３．５６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６２ｍｇ（７７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．５

[0411] 実施例２１：抗体－薬物コンジュゲート（１９）

[0412] [化73]



[0413] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１９）

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（８．０ｍＬ）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（０．１８７ｍＬ；抗体一分子に対して３．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（Ｎａｃａｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．４００ｍＬ）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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．３７３ｍＬ；抗体一分子に対して６．９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（０．０７５ｍＬ；抗体一分子に対して１３．８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１６ｍＬ得た。

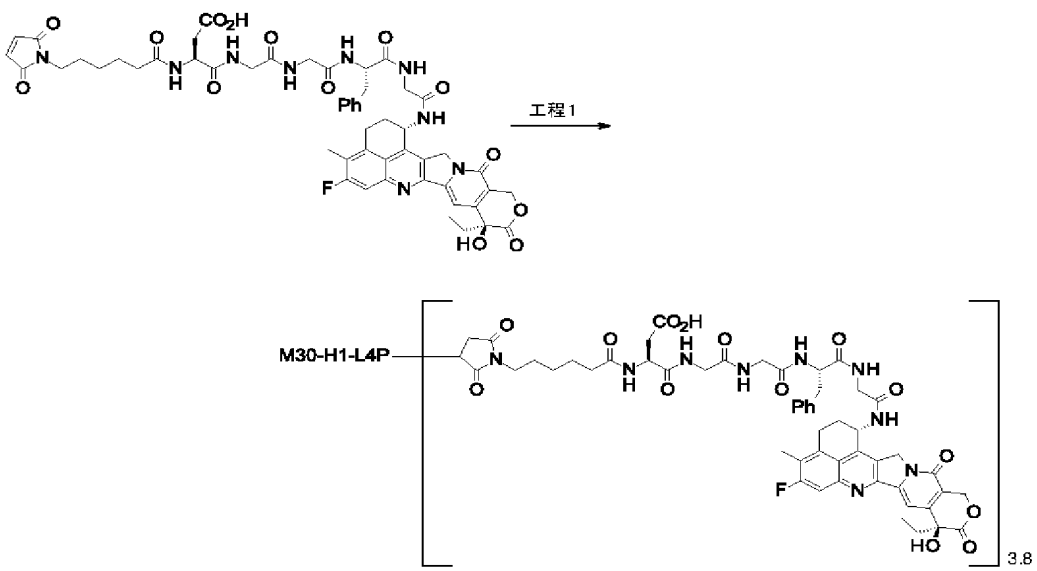
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：３．６６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５９ｍｇ（７４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．２

[0414] 実施例２２：抗体－薬物コンジュゲート（２０）

[0415]

［化74］



［0416］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２０）

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（２８０　ｎｍ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）と実施例２０の工程４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　ＮＡ

Ｃ（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。

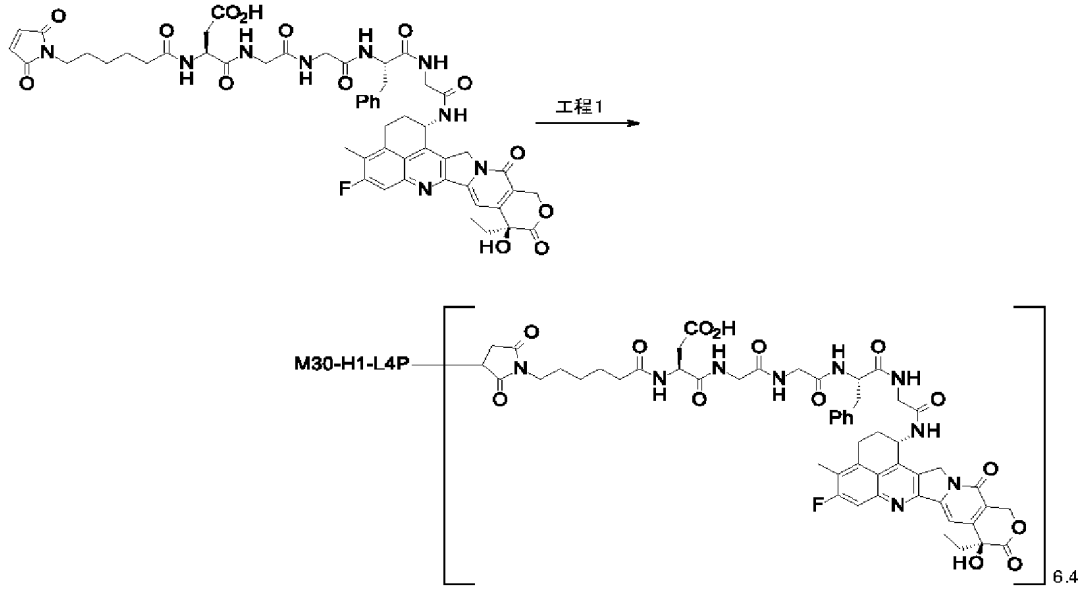
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

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：１１．１４ｍｇ／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）：３．８

[0417] 実施例２３：抗体－薬物コンジュゲート（２１）

[0418] [化75]



[0419] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２１）

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（２８０　ｎｍ吸光係数として１．６

１ｍＬｍｇ$^{-1}$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２０の工程４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。

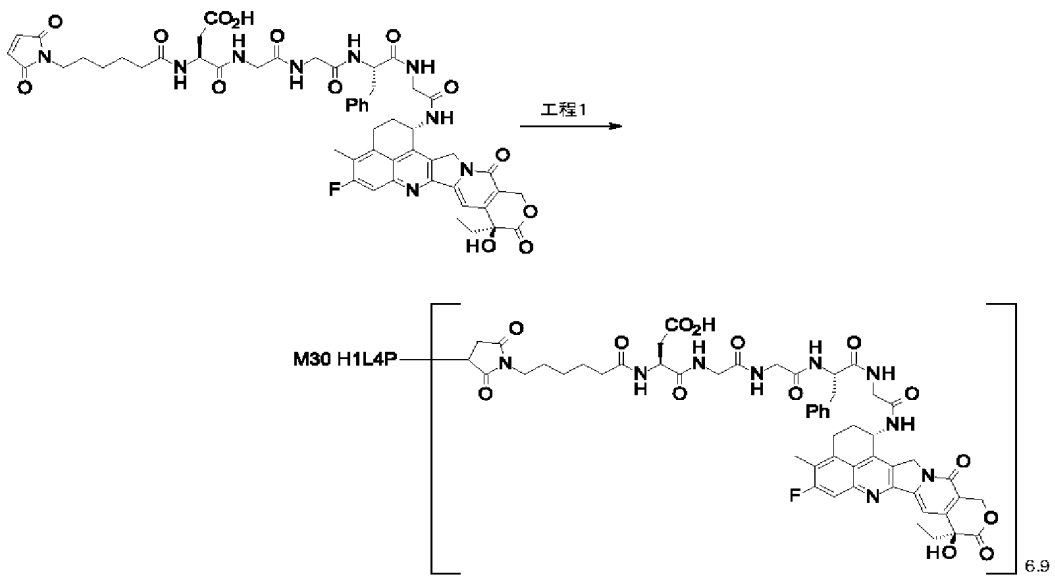
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２３５３００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．８８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．２８ｍｇ（４２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．４

[0420] 実施例２４：抗体－薬物コンジュゲート（２２）

[0421]

［化76］



［0422］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２２）

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（２８０　ｎｍ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２０の工程４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　Ｎ

ＡＣ（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。

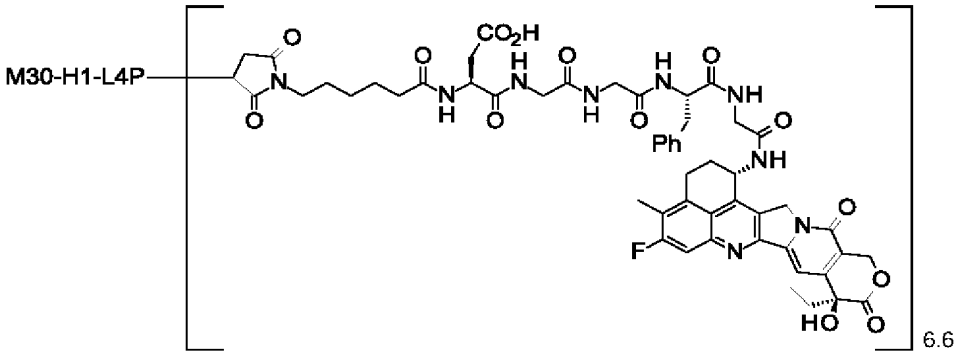
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得たのち、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

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：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）：６．９

[0423] 実施例２５：抗体－薬物コンジュゲート（２３）

[0424] [化77]



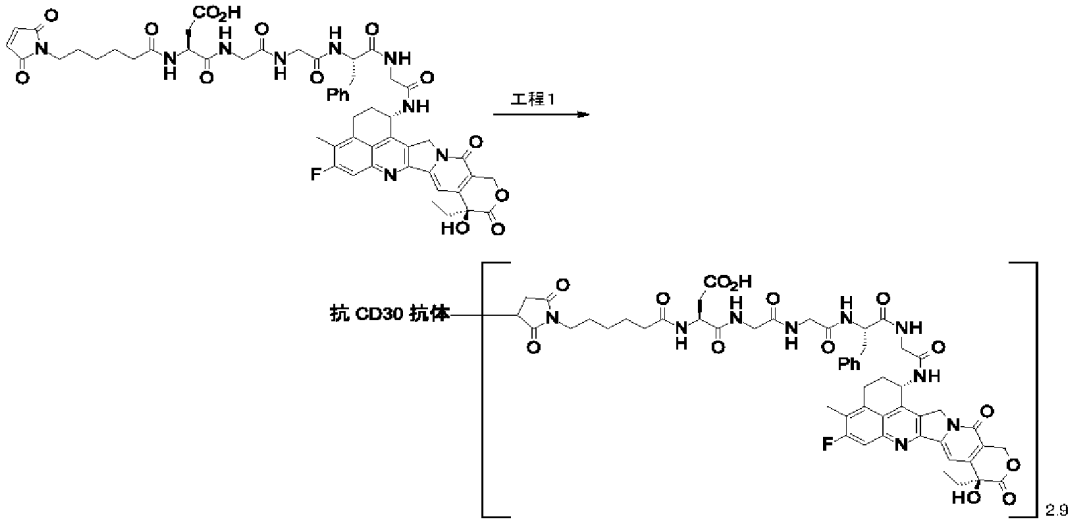
[0425] 実施例２３と実施例２４の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．０７ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．６

[0426] 実施例２６：抗体－薬物コンジュゲート（２４）

OnCusp
Ex. 1038

[0427] [化78]



[0428] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２４）

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、ＰＢＳ６．０／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（０．０１４８ｍＬ；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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；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（０．００５９３ｍＬ；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。

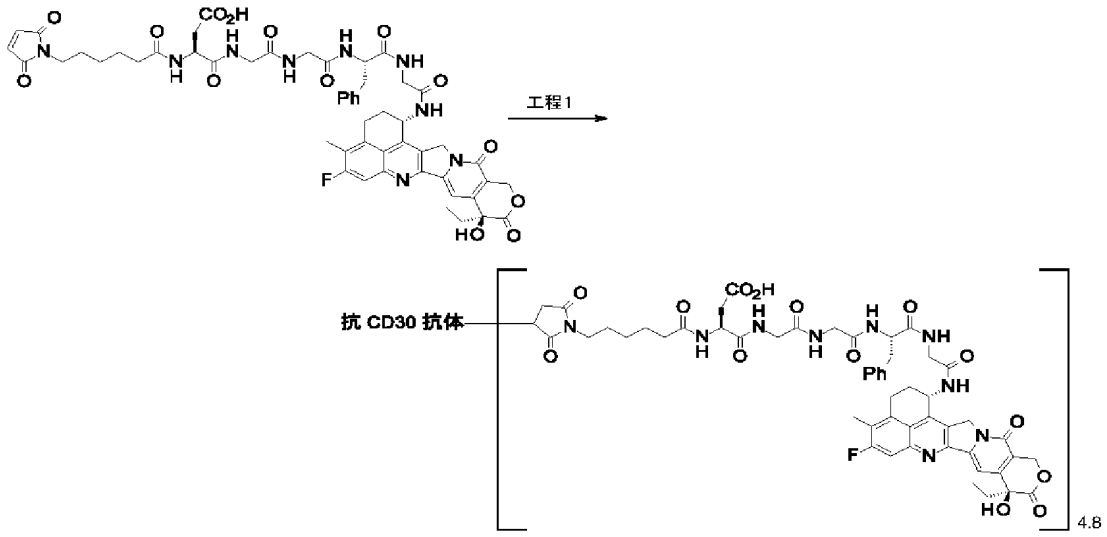
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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：０．９５ｍｇ／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）：２．９

[0429] 実施例２７：抗体－薬物コンジュゲート（２５）

[0430] [化79]



[0431] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２５）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含む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。

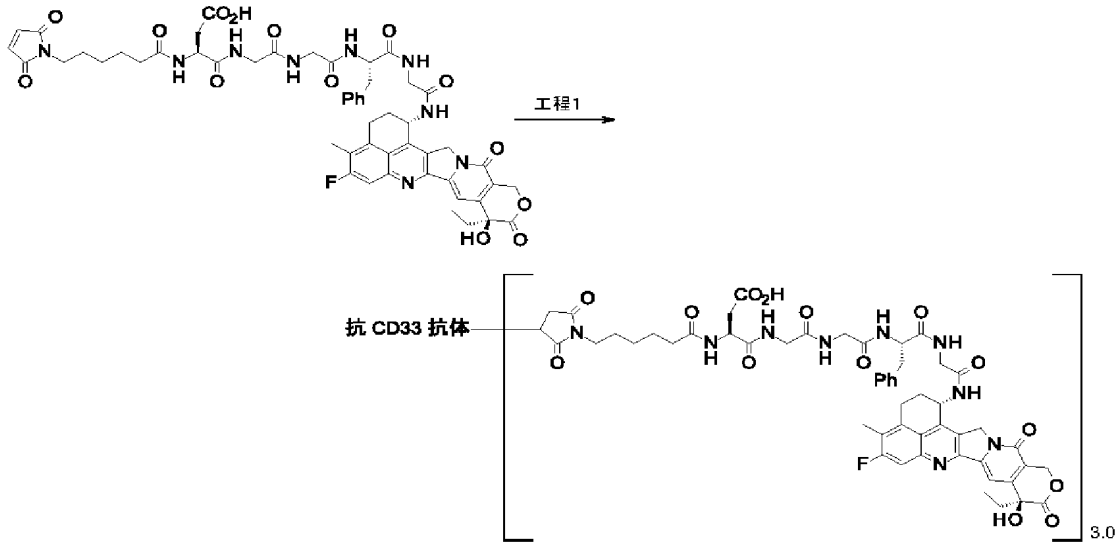
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２７０４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．０４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．２４ｍｇ（６２％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．８

[0432] 実施例２８：抗体－薬物コンジュゲート（２６）

[0433]

［化80］



［0434］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２６）

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、ＰＢＳ６．０／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（０．０１４８ｍＬ；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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；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（０．００５９３ｍＬ；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。

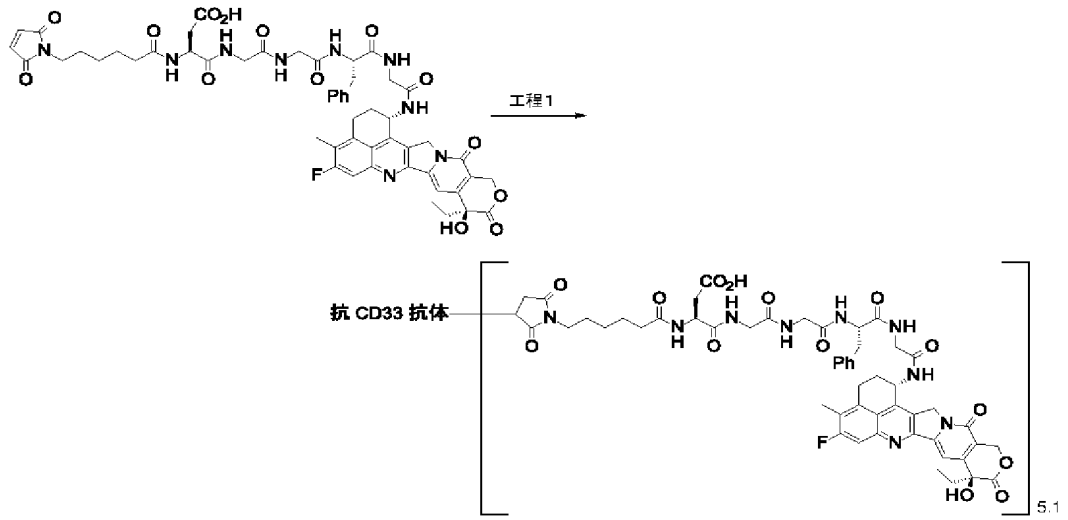
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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：０．９６ｍｇ／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）：３．０

[0435] 実施例２９：抗体－薬物コンジュゲート（２７）

[0436] [化81]



[0437] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２７）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含む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。

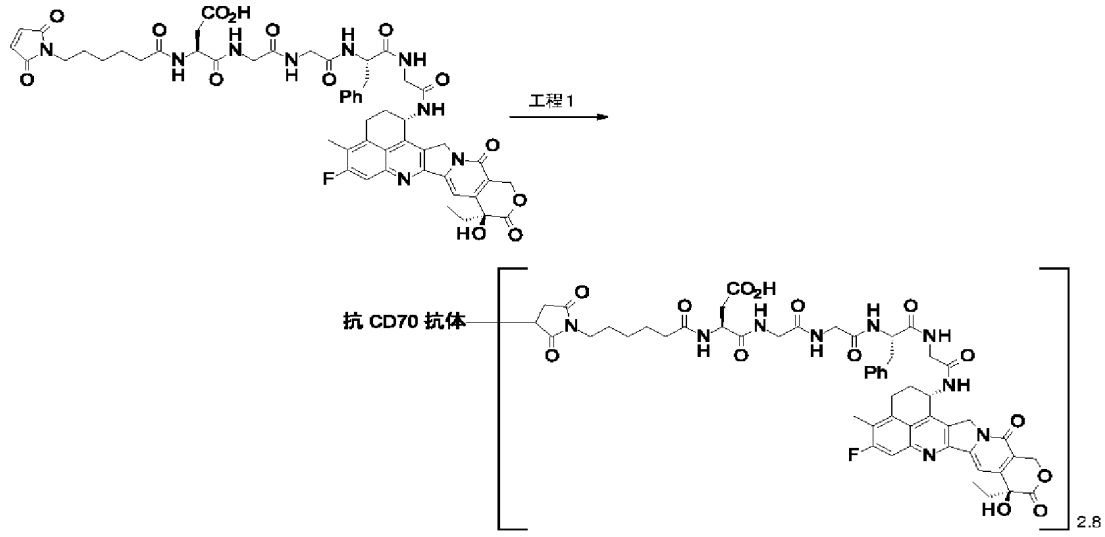
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,280}$＝２５６４００（計算推定値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算推定値）、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

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）：５．１

[0438] 実施例３０：抗体－薬物コンジュゲート（２８）

[0439]

［化82］



［0440］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２８）

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、ＰＢＳ６．０／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（０．０１４８ｍＬ；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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含むジメチルスルホキシド溶液（０．０２９７ｍＬ；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（０．００５９３ｍＬ；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。

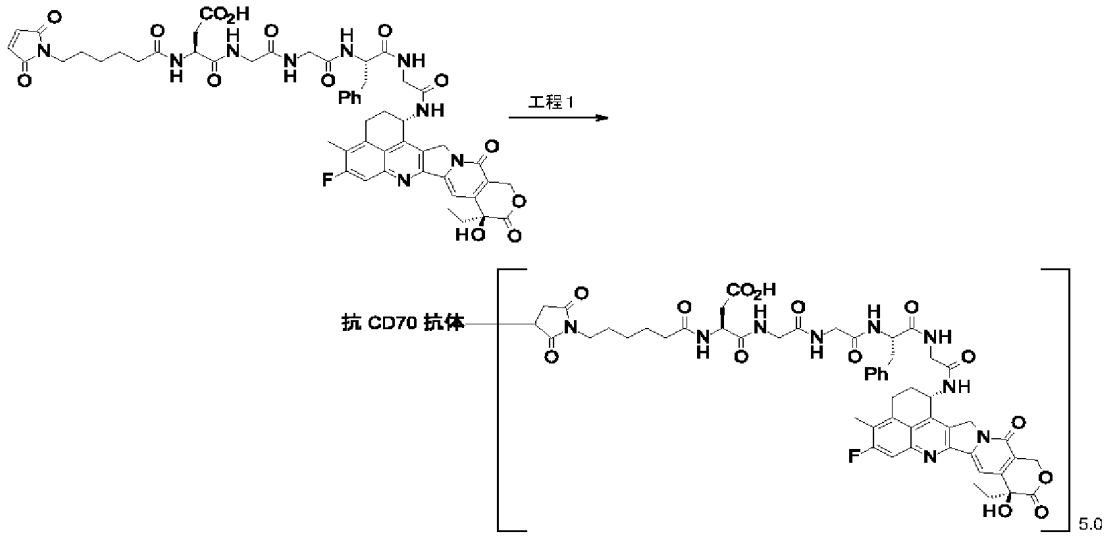
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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：１．０１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．０６ｍｇ（６１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．８

[0441] 実施例３１：抗体－薬物コンジュゲート（２９）

[0442] [化83]



[0443] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２９）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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２０の工程４で得た化合物を１０ｍＭ含む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。

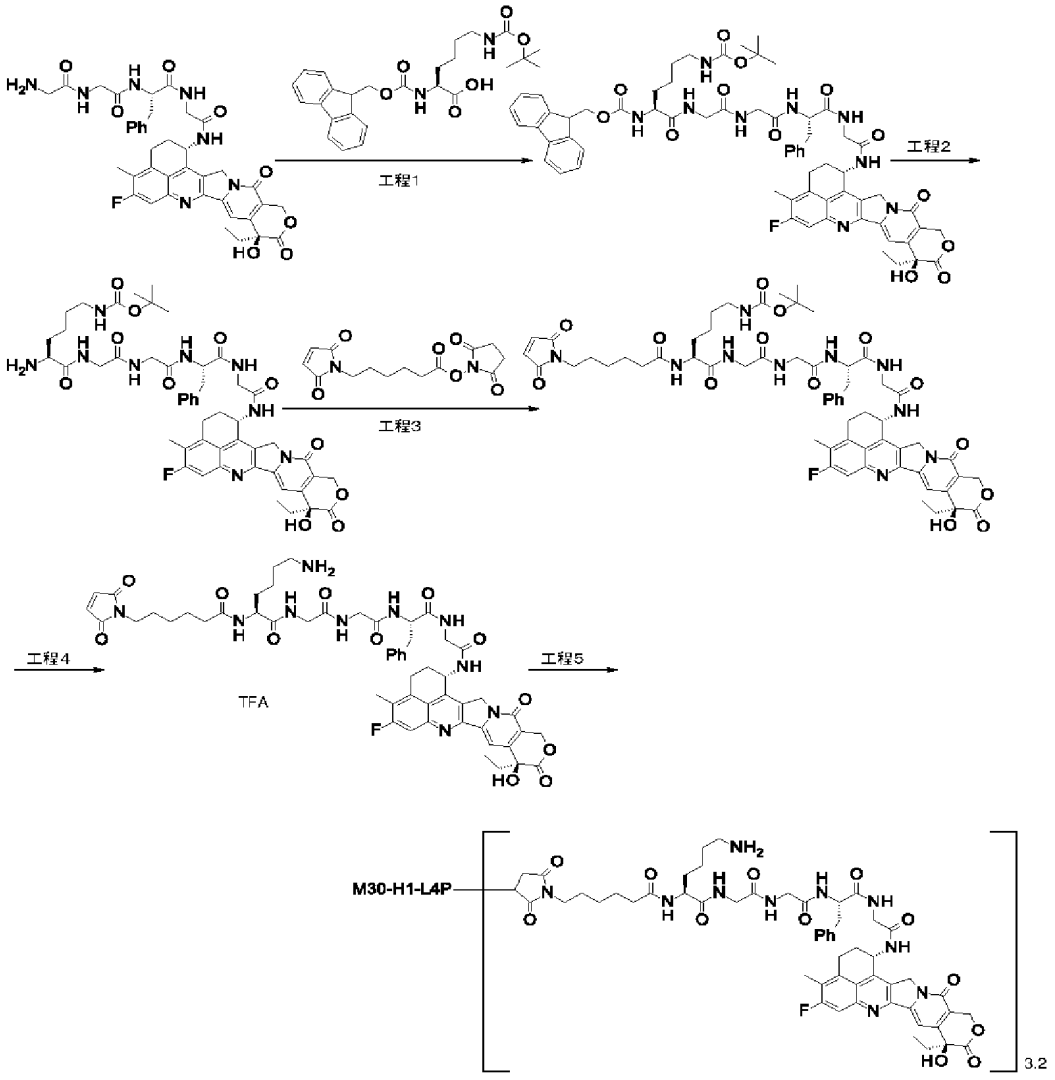
抗体濃度：１．１８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．０８ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．０

[0444] 実施例３２：抗体－薬物コンジュゲート（３０）

[0445]

OnCusp
Ex. 1038

［化84］



［0446］工程１：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－リジルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－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］グリシンアミド

グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－

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］グリシンアミド（ＷＯ９７／４６２６０に記載された医薬化合物のフリー体；０．３００ｇ，０．３９７ｍｍｏＬ）を、Ｎー［（９Ｈーフルオレンー９ーイルメトキシ）カルボニル］ーＬーアスパラギン酸４ーｔｅｒｔーブチルの代わりにN^{ε}ー（ｔｅｒｔーブトキシカルボニル）ーN^{α}ー［（９Ｈーフルオレンー９ーイルメトキシ）カルボニル］ーＬーリシンを用いて、実施例２０の工程１と同様に反応させ、標記化合物（０．４７１ｇ，９８％）を黄色固体として得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１２０４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0447] 工程２：N^{6}ー（ｔｅｒｔーブトキシカルボニル）ーＬーリジルグリシルグリシルーＬーフェニルアラニルーＮー［（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］グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（０．４１７ｇ，０．３９１ｍｍｏＬ）を、実施例２０の工程２と同様に反応させ、標記化合物を（０．２７２ｇ，７１％）を淡黄色固体として得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0448] 工程３：N^{6}ー（ｔｅｒｔーブトキシカルボニル）ーN^{2}ー［６－（２，５－ジオキソー２，５－ジヒドロー１Ｈーピロールー１ーイル）ヘキサノイル］ーＬーリジルグリシルグリシルーＬーフェニルアラニルーＮー［（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］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（０．２１０ｇ，０．２１３ｍｍｏＬ）を、実施例２０の工程３と同様に反応させ、標記化合物を（６３．０ｍｇ，２１％）を淡黄色固体として得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１７５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0449] 工程４：Ｎ^{2}－［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－リジルグリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－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］グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩

氷冷下、上記工程３で得た化合物（６３．０ｍｇ，５３．６μｍｏＬ）にトリフルオロ酢酸（２．００ｍＬ）を加え、室温にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物（５０．０ｍｇ，７８％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１３－１．３９（４Ｈ，ｍ），１．４３－１．５８（７Ｈ，ｍ），１．６１－１．７３（１Ｈ，ｍ），１．８０－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．２８（４Ｈ，ｍ），２．４３（３Ｈ，ｓ），２．７２－２．８４（４Ｈ，ｍ），３．００（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，３．９Ｈｚ），３．２０（２Ｈ，ｂｒｓ），３．５５－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．２０－４．３０（１Ｈ，ｍ），４．４２－４．５２（１Ｈ，ｍ），５．２７（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２３．７，１９．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２１．９，１６．４Ｈｚ），５．５５－５．６５（１Ｈ，ｍ），６．５６（１Ｈ，ｓ），７．０２（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３４（１Ｈ，ｓ），７．６４（３Ｈ，ｂｒｓ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），７．９８－８．０４（２Ｈ，ｍ），８．０９－８．２０（２Ｈ，ｍ），８．３７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４７（１

Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０７５（Ｍ＋Ｈ）$^+$

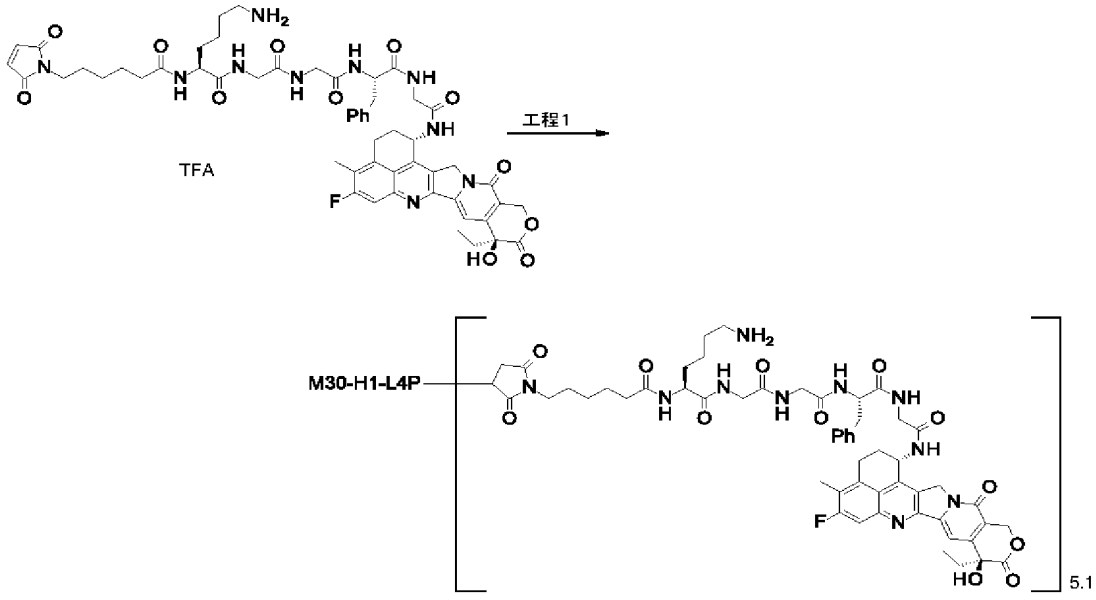
[0450] 工程５：抗体－薬物コンジュゲート（３０）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程４で得た化合物を用いて、実施例４の工程１と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１２．０４ｍｇ／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

[0451] 実施例３３：抗体－薬物コンジュゲート（３１）

[0452] [化85]



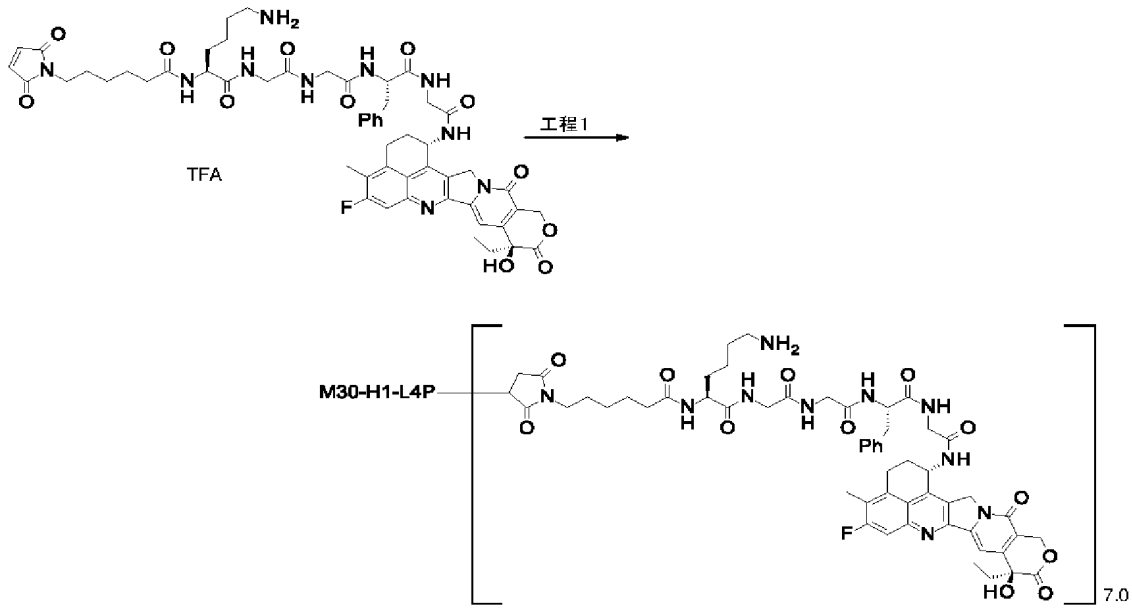
[0453] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３１）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例３２の工程４で得た化合物を用いて、実施例５の工程１と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．７９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．７４ｍｇ（８６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．１

[0454] 実施例３４：抗体－薬物コンジュゲート（３２）

[0455] [化86]



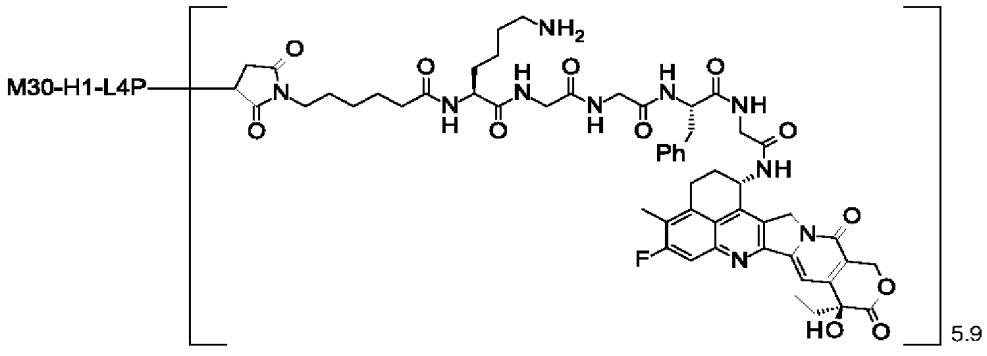
[0456] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３２）

参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び実施例３２の工程４で得た化合物を用いて、実施例６の工程１と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１．８７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．２２ｍｇ（９０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．０

[0457] 実施例３５：抗体－薬物コンジュゲート（３３）

[0458] [化87]



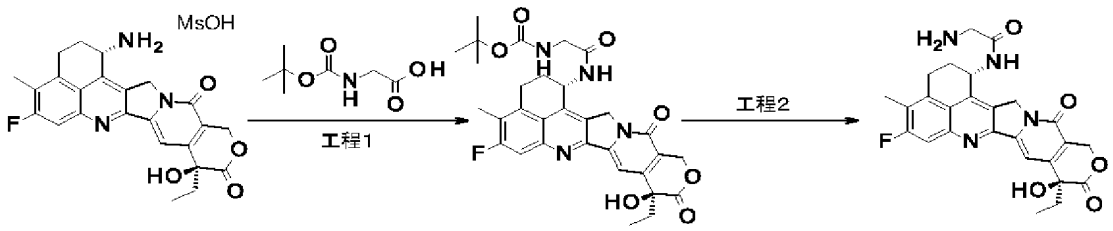
[0459] 実施例３３と実施例３４の抗体－薬物コンジュゲートのほぼ全量を混合し、製造方法１に記載した共通操作Ａを使用して溶液を濃縮し、標記抗体－薬

物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２２．２１ｍｇ，抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．９

[0460] 実施例３６：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］グリシンアミド

[0461] [化88]



[0462] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（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）カーバメート

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）－グリシン（０．３９５ｇ，２．２６ｍｍｏＬ）のジクロロメタン（３．００ｍＬ）溶液に、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．２６０ｇ，２．２６ｍｍｏＬ）、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（０．４３３ｍｇ，２．２６ｍｍｏＬ）を加え、室温にて１時間撹拌した。この溶液を、化合物（４）のメタンスルホン酸塩（１．００ｇ，１．８８ｍｍｏＬ）、トリエチルアミン（０．３１５ｍＬ，２．２６ｍｍｏＬ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３．００ｍＬ）からなる溶液に加え、室温にて１６．５時間撹拌した。反応溶液をクロロホルムで希釈し、１０％クエン酸溶液で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。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（１．１６ｇ，９９％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３０（９Ｈ，ｓ），１．８１－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．０９－２．２１（２Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），３．１５－３．１７（２Ｈ，ｍ），３．５５－３．５６（２Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４１（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．５６（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．２８（１Ｈ，ｓ），７．７７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．３９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５９３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0463] 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］グリシンアミド

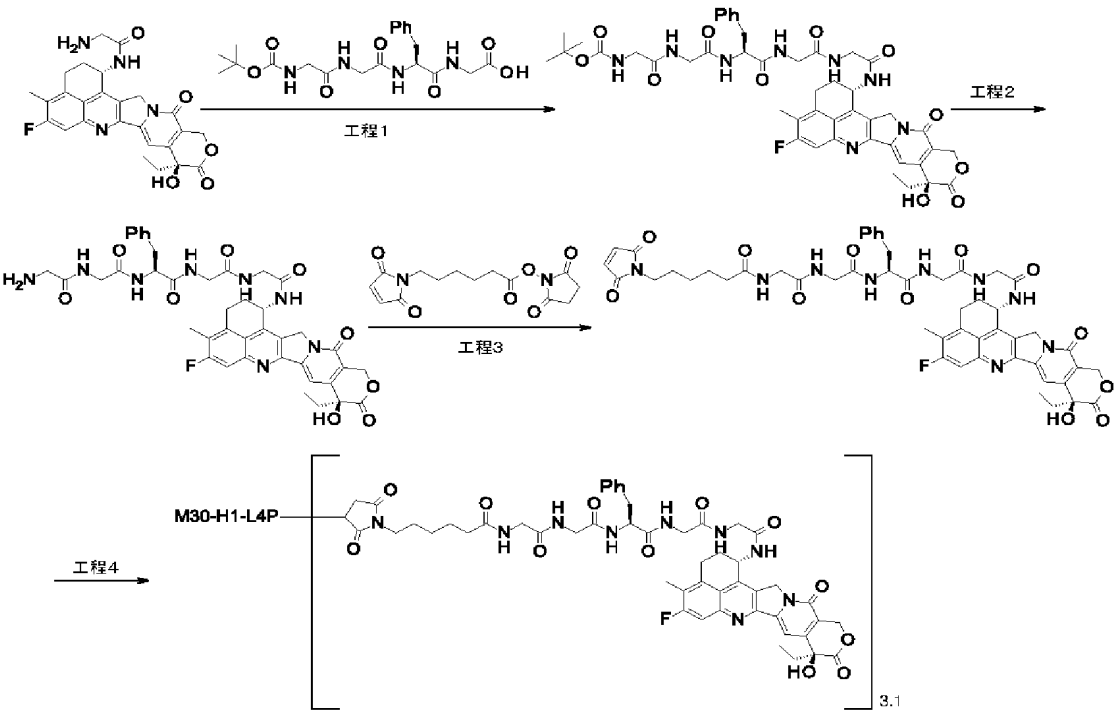
上記工程１で得た化合物（０．５１３ｇ，１．０１ｍｍｏＬ）を、実施例１７の工程４と同様に反応させ、標記化合物（０．４６３ｇ，９３％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤ$_3$ＯＤ）δ：０．９６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），１．８９－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．１４－２．１６（１Ｈ，ｍ），２．３０（３Ｈ，ｓ），２．４０－２．４２（１Ｈ，ｍ），３．１５－３．２１（２Ｈ，ｍ），３．７９－３．８６（２Ｈ，ｍ），４．６３－４．６７（１Ｈ，ｍ），５．００－５．０５（１Ｈ，ｍ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．４８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．６２－５．６４（１Ｈ，ｍ），７．４０－７．４５（２Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：４９３（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0464] 実施例３７：抗体－薬物コンジュゲート（３４）

[0465] [化89]



[0466] 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］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（０．２９２ｍｇ、０．６６９ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（５．００ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（７７．０ｍｇ，０．０．６６９ｍｍｏＬ）及び、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（１２８ｍｇ，０．６６９ｍｍｏＬ）を加えて１時間２０分撹拌した。その反応溶液を実施例３６の化合物（０．２７５ｇ，０．５５８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（５．００ｍＬ）に滴下し、室温にて１日間撹拌した。１０％クエン酸水溶液（２０．０ｍＬ）を加え、２０

ｍＬのクロロホルムで３回抽出した。得られた有機層を減圧留去し、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（０．４３０ｇ，８５％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）δ：０．９４（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．４３（９Ｈ，ｓ），１．８３－１．８５（２Ｈ，ｍ），２．２０－２．２２（１Ｈ，ｍ），２．２９（３Ｈ，ｓ），２．３６－２．３９（２Ｈ，ｍ），２．５０－２．５３（１Ｈ，ｍ），２．６７（１Ｈ，ｓ），３．０８－３．１１（１Ｈ，ｍ），３．１８－３．２１（１Ｈ，ｍ），３．６３－３．６７（４Ｈ，ｍ），３．７８－３．８２（１Ｈ，ｍ），３．９９（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２３．５，１６．８Ｈｚ），４．１６（１Ｈ，ｓ），４．５８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．４Ｈｚ），５．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．４Ｈｚ），５．５９－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．８９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），７．１５－７．１７（３Ｈ，ｍ），７．２８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），７．４１（１Ｈ，ｓ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９１１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0467] 工程２：グリシルグリシルーＬーフェニルアラニルグリシルーＮー［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチルー５－フルオロー９－ヒドロキシー４－メチルー１０，１３－ジオキソー２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロー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］グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（０．２２７ｇ，０．２４９ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１．００ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（３．００ｍＬ）を加え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（０．２００ｇ，９９％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）δ：０．９３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８５（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），２．２４－２．４５（５Ｈ，ｍ），２．３２（３Ｈ，ｓ），２．５６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，５．５Ｈｚ），３．０９－３．２５（２Ｈ，ｍ），３．６６－３．７６（６Ｈ，ｍ），４．１８－４．２４（１Ｈ，ｍ），４．７６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．１８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．６３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），６．９３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），７．１７（３Ｈ，ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．３０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．４２（１Ｈ，ｓ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：８１１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0468] 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］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（０．１２５ｇ，０．１５４ｍｍｏＬ）を、実施例２０の工程３と同様に反応させ、標記化合物（０．０７７５ｇ，５０％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$DMSO-d_6$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１８－１．１９（２Ｈ，ｍ），１．４５－１．４８（４Ｈ，ｍ），１．８３－１．８５（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．１７（４Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．６８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝２４．４，１４．７Ｈｚ），２．８３－２．８７（１Ｈ，ｍ），３．１７－３．７８（１２Ｈ，ｍ），４．４２－４．４５（１Ｈ，ｍ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．４１（２Ｈ，ｓ），５．５８－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２９（６Ｈ，ｍ），７．７６

（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９７－８．００（１Ｈ，ｍ），８．０９－８．１２（３Ｈ，ｍ），８．２５－８．２８（１Ｈ，ｍ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１００４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0469] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（３４）

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（２８０　ｎｍ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；０．１０２ｍＬ）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（０．００９ｍＬ）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、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。

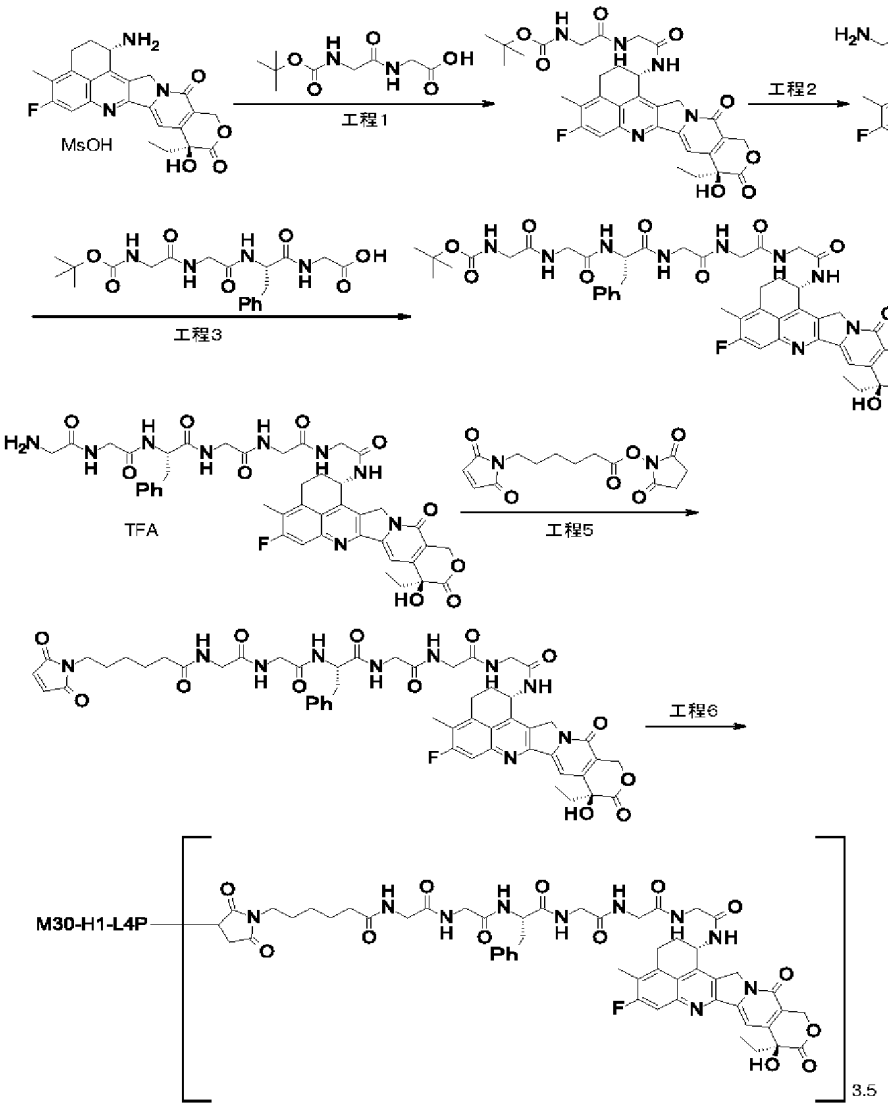
特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅ（モル吸光係数として、$\varepsilon_{A,2}$

$_{80}$＝２３５３００（計算値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算値）、$\varepsilon_{D,280}$＝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：１２．４ｍｇ／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）：３．１

[0470] 実施例３８：抗体－薬物コンジュゲート（３５）

[0471] [化90]



[0472] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）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］グリシンアミド

化合物（４）のメタンスルホン酸塩（０．８００ｇ，１．５１ｍｍｏＬ）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）－グリシルグリシン（０．４１９ｇ、１．８１ｍｍｏＬ）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（０．９６５ｇ，９９％）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），１．２３（９Ｈ，ｓ），１．８２－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１１－２．１９（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），３．１６－３．１７（２Ｈ，ｍ），３．５２（２Ｈ，ｄｄｄ，Ｊ＝２１．３，１５．５，４．７Ｈｚ），３．７７（２Ｈ，ｄｄｄ，Ｊ＝２４．３，１６．８，５．９Ｈｚ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５６－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．０４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．１２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．３１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６５０（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0473] 工程２：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］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（０．８８４ｇ，１．３６ｍｍｏＬ）を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（０．７８７ｇ，定量的）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），１．８２－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１１－２．１８（２Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），３．１７－３．１８（２Ｈ，ｍ），３．６３（２Ｈ，ｓ），３．８８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５６－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５６（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０１（３Ｈ，ｂｒｓ），８．６５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），８．７２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５５０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0474] 工程３：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシルフェニルアラニルグリシルグリシル－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］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（０．４００ｇ，０．７２８ｍｍｏＬ）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）－グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシン（０．３８１ｍｇ、０．８７３ｍｍｏＬ）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（０．５４５ｇ，７７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３７（９Ｈ，ｓ），１．８０－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０９－２．１１（１Ｈ，ｍ），２．１８－２．２１（１Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７２－２．７７（１Ｈ，ｍ），３．０１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．３Ｈｚ），３．１６－３．１７（２Ｈ，ｍ），３．５２－３．８３（１０Ｈ，ｍ），４．４８－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．２１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８

Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．１８－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．３Ｈｚ），８．０２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１５－８．１９（２Ｈ，ｍ），８．３０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９６８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0475] 工程４：グリシルグリシルフェニルアラニルグリシルグリシル－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］グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程３で得た化合物（０．４２９ｇ，０．４４３ｍｍｏＬ）を、実施例１の工程２と同様に反応させ、標記化合物（０．３８５ｇ，定量的）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），１．８２－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１１－２．１９（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．３Ｈｚ），３．１６－３．１８（２Ｈ，ｍ），３．５７－３．５８（２Ｈ，ｍ），３．６７－３．７６（７Ｈ，ｍ），３．８２－３．９０（１Ｈ，ｍ），４．５３－４．５６（１Ｈ，ｍ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１７－７．１９（１Ｈ，ｍ），７．２２－７．２９（４Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．００（３Ｈ，ｂｒｓ），８．０７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．２２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．３６（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１０．９，７．０Ｈｚ），８．４７－８．５２（２Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：８６８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0476] 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］グリシルグリシルフェニルアラニルグリシルグリシル－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］グリシンアミド

上記工程４で得た化合物（０．２７８ｇ，０．３２０ｍｍｏＬ）を、実施例２０の工程３と同様に反応させ、標記化合物（０．１６６ｇ，４９％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１４－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．４４－１．４９（４Ｈ，ｍ），１．８０－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．１３（３Ｈ，ｍ），２．２０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１４．１Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．３，８．７Ｈｚ），３．０１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．３，４．３Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），３．３５－３．３８（２Ｈ，ｍ），３．５６－３．８４（１０Ｈ，ｍ），４．４８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．１，９．２Ｈｚ），５．２３（２Ｈ，ｓ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５５－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．２０－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．００（２Ｈ，ｑ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．０６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．１８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．２８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０６１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0477] 工程６：抗体－薬物コンジュゲート（３５）

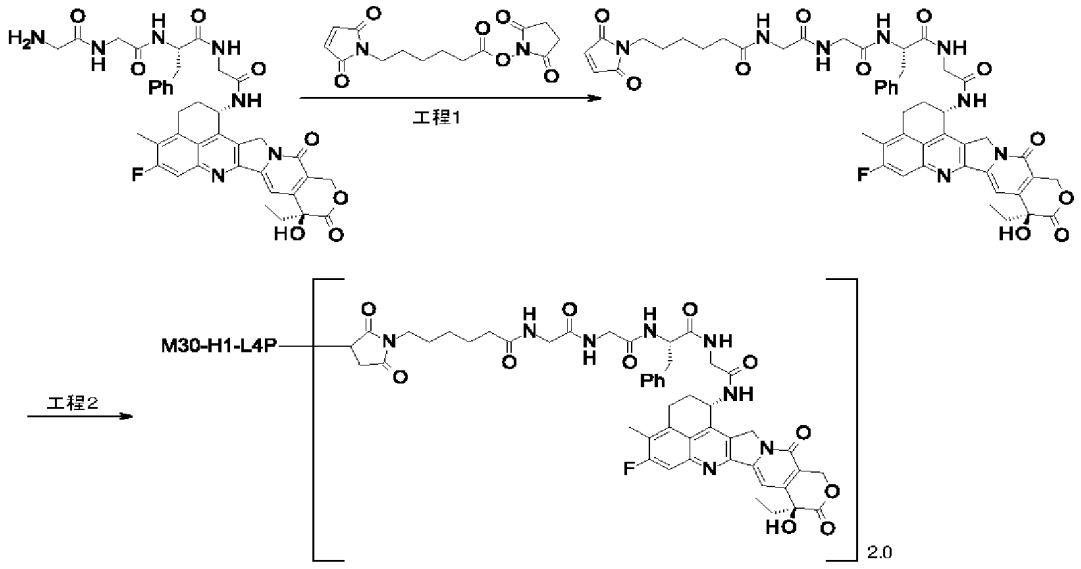
参考例２にて作製したＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体及び上記工程５で得た化

合物を用いて、実施例１６の工程７と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲートを得た。

抗体濃度：１１．７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．２ｍｇ（６６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．５

[0478] 実施例３９：抗体－薬物コンジュゲート（３６）

[0479] [化91]



[0480] 工程１：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－［（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］グリシンアミド

グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－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］グリシンアミド（ＷＯ９７／４６２６０に記載された医薬化合物のフリー体；０．１５０ｇ，０．２００ｍｏＬ）を、実施例２０の工程

３と同様に反応させ、標記化合物（７０．０ｍｇ，３７％）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），１．１５－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．４１－１．５０（４Ｈ，ｍ），１．８０－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．１２（４Ｈ，ｍ），２．１７－２．２３（１Ｈ，ｍ），２．３５－２．４０（１Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），２．７３－２．８１（１Ｈ，ｍ），２．９８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．６Ｈｚ），３．１５－３．２０（２Ｈ，ｍ），３．５３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．６，５．７Ｈｚ），３．６２－３．７７（５Ｈ，ｍ），４．３９－４．４５（１Ｈ，ｍ），５．２２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．３９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．５５－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９８（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．３Ｈｚ），７．９５－８．００（１Ｈ，ｍ），８．０５－８．０９（２Ｈ，ｍ），８．２８－８．３１（１Ｈ，ｍ），８．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９４７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0481] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（３６）

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（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り、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１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。

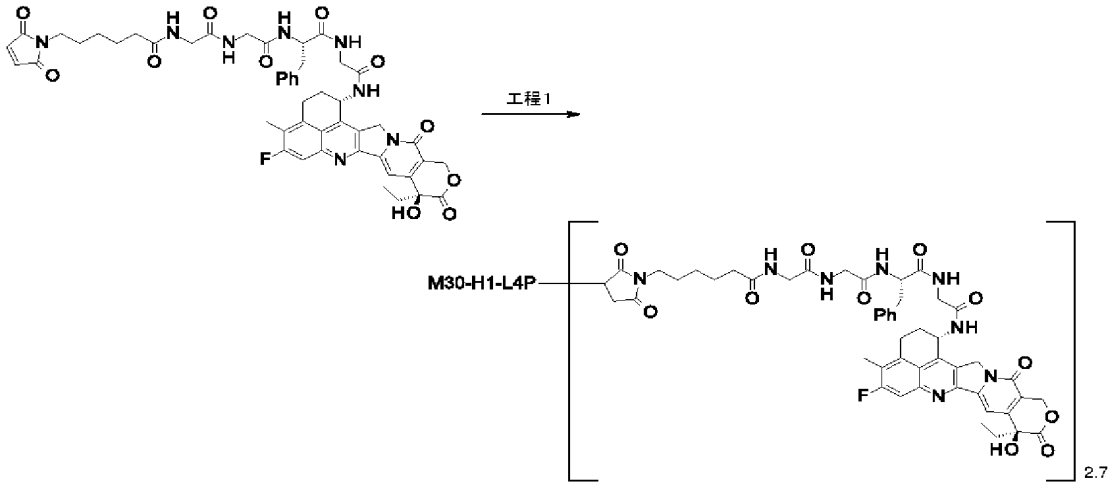
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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（計算値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算値）、$\varepsilon_{D,280}$＝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：１．２３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．３８ｍｇ（７４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．０

[0482] 実施例４０：抗体－薬物コンジュゲート（３７）

[0483] [化92]



［0484］工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３７）

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（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り、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３９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（０．０５９０ｍＬ；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。

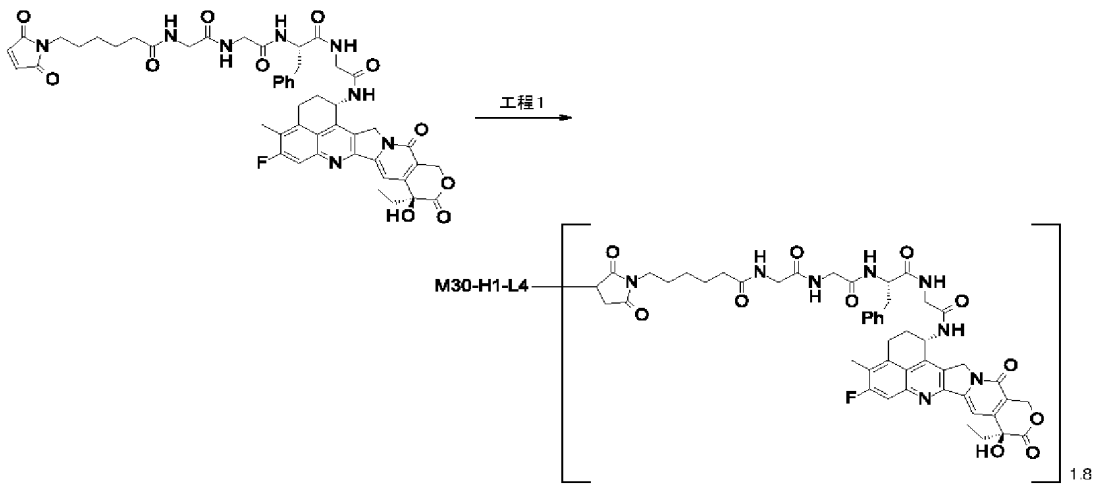
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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（計算値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算値）、$\varepsilon_{D,280}$＝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）：２．７

[0485] 実施例４１：抗体－薬物コンジュゲート（３８）

[0486] [化93]



[0487] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３８）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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３９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（０．０２９５ｍＬ；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。

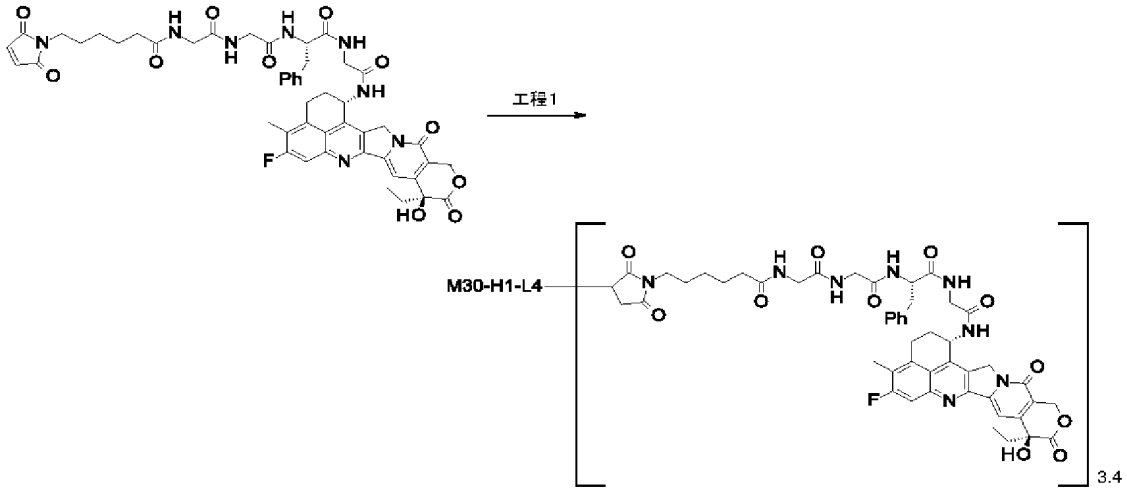
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ７．４を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

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（計算値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算値）、$\varepsilon_{D,280}$＝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：１．１１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．６６ｍｇ（６７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：１．８

[0488] 実施例４２：抗体－薬物コンジュゲート（３９）

[0489] [化94]



[0490] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３９）

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、ＰＢＳ６．０／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り、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３９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（０．０５９０ｍＬ；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（計算値）、$\varepsilon_{A,370}$＝０（計算値）、$\varepsilon_{D,280}$＝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）：３．４

[0491]（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ｃＤＮＡ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。

[0492] （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機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　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＿Ｖ１＿３．１＿２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。

[0493] （試験例３）抗体－薬物コンジュゲートの抗細胞試験（１）

試験例２で作製されたＣＥＭ＿Ｖ１＿３．１＿２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＿Ｖ１＿３．１＿２細胞、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ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）

抗体－薬物コンジュゲート（６）、（２３）は、ＣＥＭ＿Ｖ１＿３．１＿２細胞に対してＩＣ$_{50}$＜０．１（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。抗体－薬物コンジュゲート（３）、（３３）、（３９）は、０．１＜ＩＣ$_{50}$＜１（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。抗体－薬物コンジュゲート（１３）、（１４）、（１５）、（１６）、（１７）、（２０）、（３０）、（３５）、（３７）は、１＜ＩＣ$_{50}$＜１００（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。一方、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ細胞に対してはいずれの抗体－薬物コンジュゲートも抗細胞効果を示さなかった（＞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））。

[0494] （試験例４）抗体－薬物コンジュゲートの抗細胞試験（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^{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（７）、（８）、（２４）、（２５）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）

ＳＲ細胞に対して、抗体－薬物コンジュゲート（７）、（８）、（２４）、（２５）は、IC_{50}＜０．０１（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。一方、Ｄａｕｄｉ細胞に対してはいずれの抗体－薬物コンジュゲートも抗細胞効果を示さなかった（＞４．０（ｎＭ））。また、抗ＣＤ３０抗体はいずれの細胞に対しても抗細胞効果を示さなかった（＞４．０（ｎＭ））。

[0495]（試験例５）抗体－薬物コンジュゲートの抗細胞試験（３）

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（９）、（１０）、（２６）、（２７）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）

ＨＬ－６０細胞に対して、抗体－薬物コンジュゲート（１０）はIC_{50}＜１（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。抗体－薬物コンジュゲート（９）、（２

６）、（２７）は、１＜ＩＣ$_{50}$＜１００（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。一方、Ｒａｊｉ細胞に対してはいずれの抗体－薬物コンジュゲートも抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。また、抗ＣＤ３３抗体は、いずれの細胞に対しても抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0496]（試験例６）抗体－薬物コンジュゲートの抗細胞試験（４）

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（１１）、（１２）、（２８）、（２９）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）

Ｕ２５１細胞に対して、抗体－薬物コンジュゲート（１２）、（２９）は、１＜ＩＣ$_{50}$＜１０（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。抗体－薬物コンジュゲート（１１）、（２８）は、１０＜ＩＣ$_{50}$＜１００（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。一方、ＭＣＦ－７細胞に対してはいずれの抗体－薬物コンジュゲートも抗細胞効果を示さなかった（≧９０（ｎＭ））。また、抗ＣＤ７０抗体は、いずれの細胞に対しても抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0497]（試験例７）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、腫瘍の長径及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（１）、（２）、（１８）、（１９）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１７に示す。図中の白ひし形線は無処置の腫瘍、黒ひし形線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１）投与時、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（２）投与時、黒三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１８）投与時、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）投与時の効果を示す。

抗体－薬物コンジュゲート（１）、（２）、（１８）、（１９）の投与によって腫瘍体積が著しく減少し、特に抗体－薬物コンジュゲート（２）、（１９）の投与では、Ｄａｙ１８では腫瘍は完全に消失し、Ｄａｙ３９後も再発は認められなかった。

また、抗体－薬物コンジュゲート（１）、（２）、（１８）、（１９）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。

[0498]（試験例８）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）、（１９）（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）１ｍｇ／ｋｇ投与時、白四角線は３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒丸線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）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）、（１９）は用量依存的に腫瘍の増殖抑制効果を発揮した。

[0499]（試験例９）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（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（１）、（２）、（１８）、（１９）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、黒ひし形線はＭ３０－Ｈ１－Ｌ４Ｐ抗体、黒四角線は抗体－薬物コンジュゲート（１）投与時、白四角線は抗体－薬物コンジュゲート（２）投与時、黒三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１８）投与時、白三角線は抗体－薬物コンジュゲート（１９）投与時の効果を示す。

抗体－薬物コンジュゲート（１）、（２）、（１８）、（１９）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。

また、抗体－薬物コンジュゲート（１）、（２）、（１８）、（１９）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。

[0500] （試験例１０）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（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１４に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（３）、（２０）、（３０）（３，１０ｍｇ／ｋｇ）をＤａｙ１４に各用量ｑｄ×１のスケジュール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、黒四角点線は抗体－薬物コンジュゲート（３）３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒四角実線は１０ｍｇ／ｋｇ投与時、黒三角点線は抗体－薬物コンジュゲート（２０）３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒三角実線は１０ｍｇ／ｋｇ投与時、黒丸点線は抗体－薬物コンジュゲート（３０）３ｍｇ／ｋｇ投与時、黒丸実線は１０ｍｇ／ｋｇ投与時の

効果を示す。

抗体－薬物コンジュゲート（３）、（２０）、（３０）の投与によって腫瘍体積が著しく減少し、いずれも用量依存的に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（３）、（２０）、（３０）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

[0501] 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　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＨ１のアミノ酸配列

配列番号４　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＨ２のアミノ酸配列

配列番号５　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＨ３のアミノ酸配列

配列番号６　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＬ１のアミノ酸配列

配列番号７　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＬ２のアミノ酸配列

配列番号８　－　Ｍ３０抗体のＣＤＲＬ３のアミノ酸配列

配列番号９　－　Ｍ３０－Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号１０　－　Ｍ３０－Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号１１　－　Ｍ３０－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

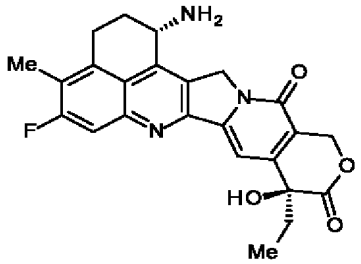
配列番号３０　－　抗ＣＤ３３抗体軽鎖のアミノ酸配列

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

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：

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

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又はL^P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)-、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-、-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-、又は-C(=O)-$(CH_2)n^5$-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、n^5は、１から８の整数を示し、

L^2は、-NH-(CH_2-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-(CH_2CH_2-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、-S-$(CH_2)n^8$-C(=O)-、又は単結合を示し、

ここで、n^6は、０から６の整数を示し、n^7は、１から４の整数を示し、n^8は、１から６の整数を示し、

L^Pは、３から８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-$(CH_2)n^9$-、-O-、又は単結合を示し、

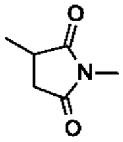
ここで、n^9は、１から６の整数を示し、R^1は、水素原子、炭素数１から６のアルキル基、$-(CH_2)n^a-COOH$、又は$-(CH_2)n^b-OH$を示すが、n^aは、整数の１から４を示し、n^bは、１から６の整数を示し、

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、$-(CH_2)n^c-NH_2$、$-(CH_2)n^d-COOH$、又は$-(CH_2)n^e-OH$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^cは、０から６の整数を示し、n^dは、整数の１から４を示し、n^eは、整数の１から４を示すが、n^cが０であるときは、R^2及びR^3は同一とはならず、

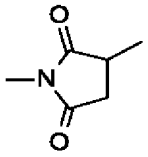
L^cは、$-CH_2-$又は$-C(=O)-$を示し、

-(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。

ただし、リンカーのL^1、L^2、及びL^pのいずれか１箇所又は２箇所以上は親水性構造を含む構造であり、

この親水性構造とは、

リンカーL^{P}においては、

L^{P}が、そのＮ末端が親水性アミノ酸であって、グリシン以外の親水性アミノ酸をＮ末端に有するペプチド残基である場合か、あるいは、

L^{P}が、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプチド残基である場合であり、

リンカーL^{1}においては、L^{1}が、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である場合であり、

リンカーL^{2}においては、L^{2}が、-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である場合である。）

[請求項2] L^{1}が、-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-、-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-、又は-CH_2-C(=O)-NH-$(CH_2)n^4$-C(=O)-、であり、

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}が、-NH-$(CH_2$-CH_2-O)n^6-CH_2-CH_2-C(=O)-、-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-、又は単結合であり、

ここで、n^{6}は、０から６の整数を示し、n^{7}は、１から４の整数を示し、

L^{P}が、３から８個のアミノ酸で構成されるペプチド残基であり、

L^{a}及びL^{b}が、単結合であり、

L^{c}が、-C(=O)-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^{1}、L^{2}、又はL^{P}のいずれか一箇所が親水性構造を含むリンカーである請求項１又は２に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項4] 親水性構造を含むリンカーがL^{P}である請求項３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項5] L^Pが、Ｎ末端にグリシン以外の親水性アミノ酸を有するペプチド残基である請求項４に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項6] グリシン以外の親水性アミノ酸が、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、チロシン、又はアルギニンである請求項５に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項7] L^PにおけるＮ末端のグリシン以外の親水性アミノ酸が、グルタミン酸、アスパラギン酸、又はリシンである請求項５に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項8] L^PにおけるＮ末端の親水性アミノ酸に続くペプチド残基が、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６又は７に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項9] L^PにおけるＮ末端の親水性アミノ酸に続くペプチド残基が、３又は４のアミノ酸からなるペプチド残基である請求項８に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項10] L^PにおけるＮ末端の親水性アミノ酸に続くペプチド残基が、GGF又はGGFGである請求項９に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項11] L^Pが、DGGF、KGGF、EGGF、DGGFG、KGGFG、又はEGGFGである請求項５から１０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] L^Pが、DGGFG、KGGFG、又はEGGFGである請求項５から１０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] リンカーが、$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-L^b-L^c-$で示される構造のリンカーである請求項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。

[請求項14] L^cが、-C(=O)-である請求項１３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項15] L^1が$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^2-C(=O)-$であり、$n^2$が２から５

の整数であり、L^2が単結合である請求項１４に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項16] n^2が５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^1が１から３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] リンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分の構造が、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-、

-NH-$(CH_2)_3$-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５から１７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19] リンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分の構造が、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-、又は

-NH-$(CH_2)_3$-C(=O)-、

である請求項５から１７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] リンカーが、-L^1-L^2-L^P-で示される構造のリンカーである請求項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。

[請求項21] L^1が-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-であり、n^2が２から５の整数であり、L^2が単結合である請求項２０に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項22] n^2が５である請求項２１に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項23] L^Pが、Ｃ末端が２または３以上のグリシンからなるオリゴペプチドであって、抗腫瘍性化合物に結合し、かつＮ末端が親水性アミノ酸となる場合であってもグリシン以外の親水性アミノ酸とはならないペプ

チド残基である請求項４に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項24] ペプチド残基が４から８のアミノ酸で構成されるリンカーである請求項２３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項25] Ｃ末端の、グリシンからなるオリゴペプチドが、２または３のグリシンからなるオリゴペプチドである請求項２３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項26] ペプチドリンカーがGGFGG、又はGGFGGGである請求項２３から２５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] L^1が-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-であり、n^2が２から５の整数である請求項２３から２６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] n^2が５である請求項２７に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項29] L^1が-(Succinimid-3-yl-N)-CH[-$(CH_2)n^3$-COOH]-C(=O)-である請求項３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項30] n^3が２または３である請求項２９に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項31] L^2が-N[-$(CH_2CH_2$-O)n^7-CH_2CH_2-OH]-CH_2-C(=O)-である請求項３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項32] n^7が２から４である請求項３１に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項33] リンカーが、-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である請求項２９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。

[請求項34] L^cが、-C(=O)-である請求項３３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項35] n^1が１から３である請求項２９から３４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36] L^Pが、GGFGである請求項２９から３５のいずれか一項に記載の抗体

ー薬物コンジュゲート。

[請求項37] リンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分の構造が、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-、

-NH-$(CH_2)_3$-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２９から３６のいずれか一項に記載の抗体ー薬物コンジュゲート。

[請求項38] リンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-L^b-L^c-部分の構造が、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-$(CH_2)_2$-C(=O)-、又は

-NH-$(CH_2)_3$-C(=O)-、

である請求項２９から３６のいずれか一項に記載の抗体ー薬物コンジュゲート。

[請求項39] 抗体ー薬物コンジュゲートにおける薬物ーリンカー構造部分が、次の薬物ーリンカー構造の群から選ばれる１種の構造である請求項１又は２に記載の抗体ー薬物コンジュゲート：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

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

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

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

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

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

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

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

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)、

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

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

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

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGF-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGF-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX)、

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-KGGFG-(NH-DX)、

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

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

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

-CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)、

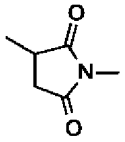
-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH_2-(N-ly-3-diminiccuS)-S-CH_2CH_2-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

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

-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGG-(NH-DX)、

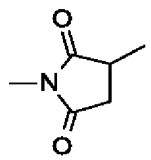
-C(=O)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFGGG-(NH-DX)。

ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：



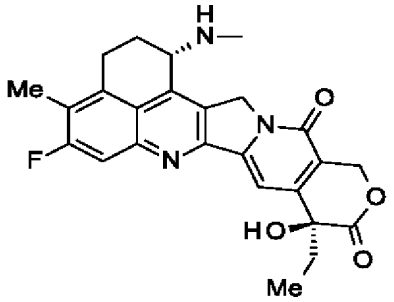
で示される構造であり、このものの３位で抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合し、

cyc.Hex(1,4)は１，４-シクロヘキシレン基を示し、-(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、

-(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40］　１抗体あたりの抗腫瘍性化合物の平均結合数が、１から１０個の範囲である請求項１から３９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41］　１抗体あたりの抗腫瘍性化合物の平均結合数が、１から８個の範囲である請求項１から３９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42］　１抗体あたりの抗腫瘍性化合物の平均結合数が、３から８個の範囲である請求項１から３９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43］　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から４２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44］　標的細胞が腫瘍細胞である請求項４３に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［請求項45］　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Ｔｅｎａ

ｓｃｉｎ－Ｃ抗体、抗ＳＬＣ４４Ａ４抗体、又は抗Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ抗体である請求項１から４４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46] 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から４４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47] 抗体が、抗Ｂ７－Ｈ３抗体である請求項１から４４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48] 請求項１から４４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49] 請求項１から４４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50] 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４９に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

[請求項51] 請求項１から４４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52] 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５１に記載の医薬組成物。

[請求項53] 請求項１から４４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。

[請求項54] 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５３に記載の治療方法。

[図1]

Ｂ７－Ｈ３バリアント１のアミノ酸配列（配列番号１）

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP
VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFP
DLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLT
GNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH
GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQS
CEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKIISDSKEDDGQEIA

[図2]

Ｂ７－Ｈ３バリアント２のアミノ酸配列（配列番号２）

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTD
ATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVIISVLRVVLGANGTYSCLVRNP
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
ＳＳＲＬＩＹＭＨＷＹＱＱＫＰＧＳＡＰＫＬＷＩＹＡＴＳＮＬＡＳＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹ
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－Ｌ５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－Ｌ６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）

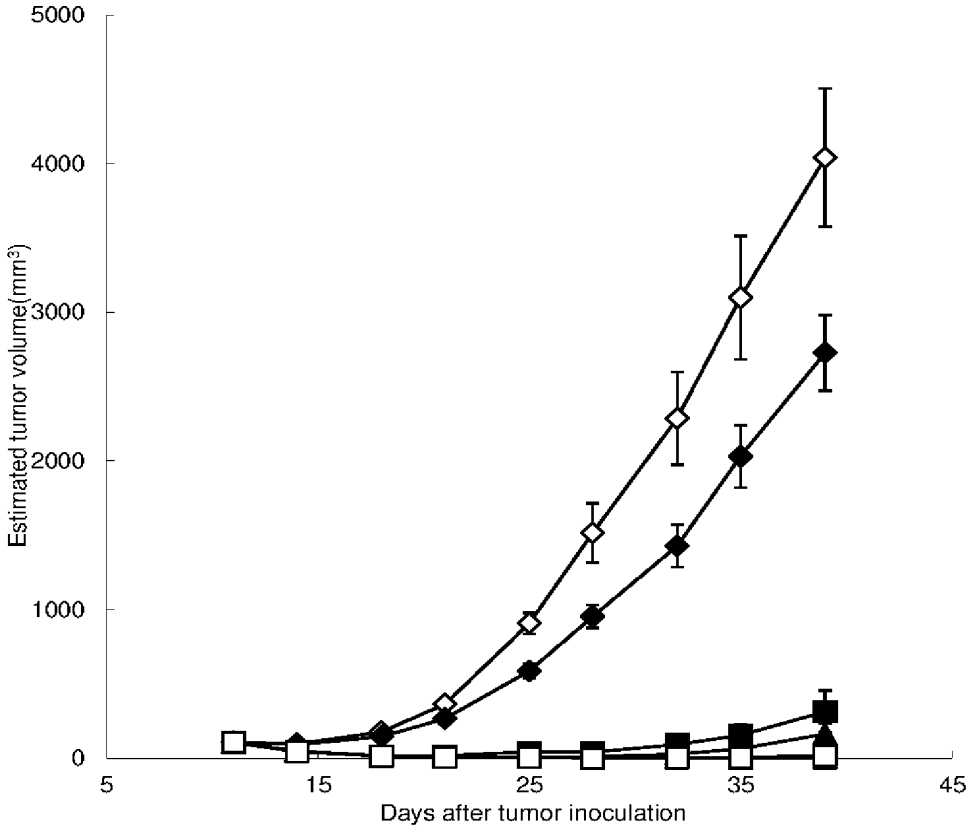
ＭＤＦＬＶＱＩＦＳＦＬＬＩＳＡＳＶＩＭＳＲＧＱＩＶＬＳＱＳＰＴＩＬＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣ
ＲＡＳＳＲＬＩＹＭＨＷＹＱＱＫＰＧＳＳＰＫＰＷＩＹＡＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴ
ＳＹＳＬＴＩＳＲＶＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＮＳＮＰＰＴＦＧＴＧＴＫＬＥＬＫＲＡＤＡＡＰＴ
ＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶ
ＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰ
ＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ

[図16]

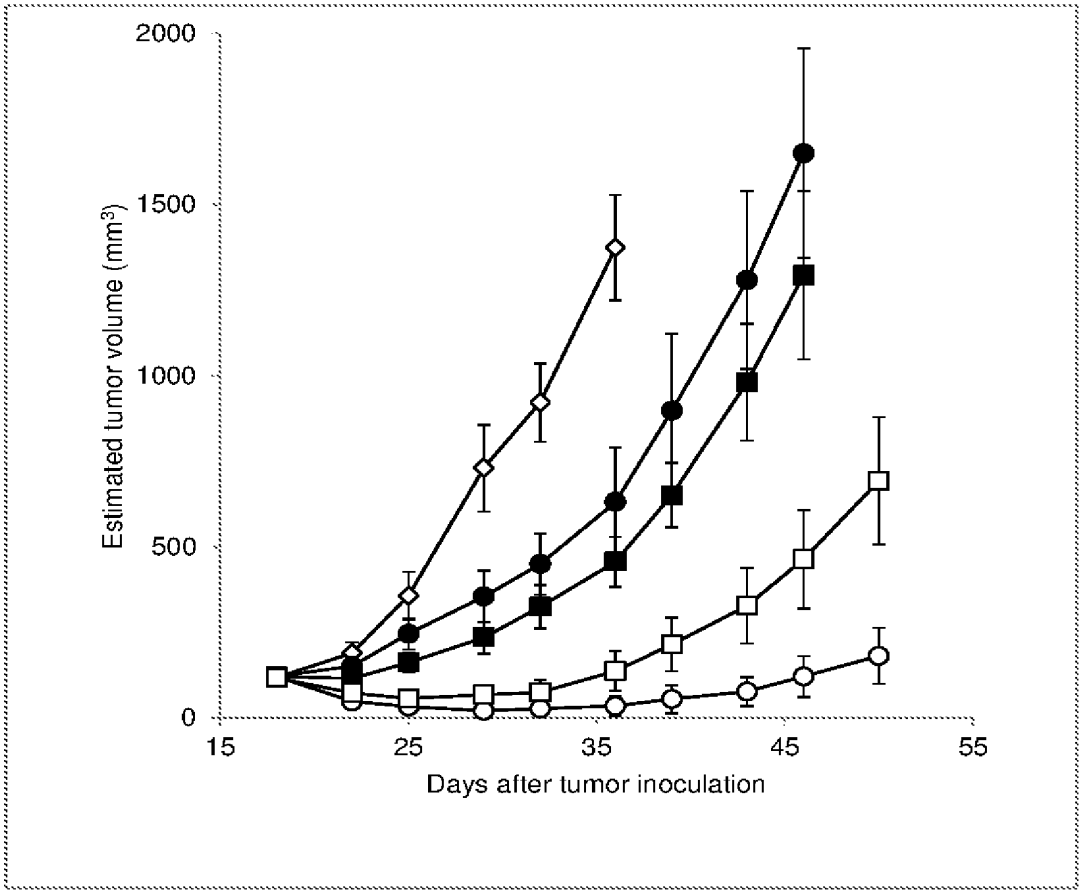
Ｂ７－Ｈ３バリアント１のヌクレオチド配列（配列番号２６）

atgctgcgtcggcggggcagccctggcatgggtgtgcatgtgggt
gcagccctgggagcactgtggttctgcctcacaggagccctggag
gtccaggtccctgaagacccagtggtggcactggtgggcaccgat
gccaccctgtgctgctccttctccccctgagcctggcttcagcctg
gcacagctcaacctcatctggcagctgacagataccaaaacagctg
gtgcacagctttgctgagggccaggaccagggcagcgcctatgcc
aaccgcacggccctcttcccggacctgctgggcacagggcaacgca
tccctgaggctgcagcgcgtgcgtgtgggcggacgagggcagcttc
acctgcttcgtgagcatccgggatttcggcagcgctgcccgtcagc
ctgcaggtggccgctccctactcgaagcccagcatgaccctggag
cccaacaaggacctgcggccagggggacacggtgaccatcacgtgc
tccagctaccagggctaccctgaggctgaggtgttctggcaggat
gggcagggtgtgcccctgactggcaaacgtgaccacgtcgcagatg
gccaacgagcagggcttgtttgatgtgcacagcatcctgcgggtg
gtgctgggtgcaaatggcacctacagctgcctggtgcgcaaccccc
gtgctgcagcaggatgcgcacagctctgtcaccatcacaccccag
agaagccccacaggagccgtggaggtccaggtcccctgaggaccgg
gtggtggccctagtgggcaccgatgccaccctgcgctgctccttc
tccccgagcctggcttcagcctggcacagctcaacctcatctgg
cagctgacagaccaccaaacagctggtgcacagtttcaccgaaggc
cgggaccagggcagcgccctatgccaaccgcacggccctcttcccg
gacctgctggcacaaggcaatgcatccctgaggctgcagcgcgtg
cgtgtggcggacgaggggcagcttcacctgcttcgtgagcatccgg
gatttcggcagcgctgccgtcagcctgcaggtggccgctccctac
tcgaagcccagcatgaccctggagcccaacaaggacctgcggccca
ggggacacggtgaccatcacgtgctccagctaccggggctaccct
gaggctgaggtgttctggcaggatgggcagggtgtgcccctgact
ggcaacgtgaccacgtcgcagatggccaacgagcagggcttgttt
gatgtgcacagcgtccctgcgggtggtgctggggtgcgaatggcacc
tacagctgccctggtgcgcaaccccgtgctgcagcaggatgcgcac
ggctctgtcaccatcacagggcagcctatgacattccccccagag
gccctgtgggtgaccgtggggctgtctgtctgtctcattgcactg
ctggtggccctggctttcgtgtgctggagaaagatcaaacagagc
tgtgaggaggagaatgcaggagctgaggaccaggatggggaggga
gaaggctccaagacagccctgcagcctctgaaacactctgacagc
aaagaagatgatggacaagaaatagcctgagcggccgccactgtg
ctggatatctgcagaattccaccacactggactagtggatccgag
ctcggtaccaagcttaagtttaaaccgctgatcagcctcgactgt
gccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgcc
ttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaata
aaatgaggaaattgc

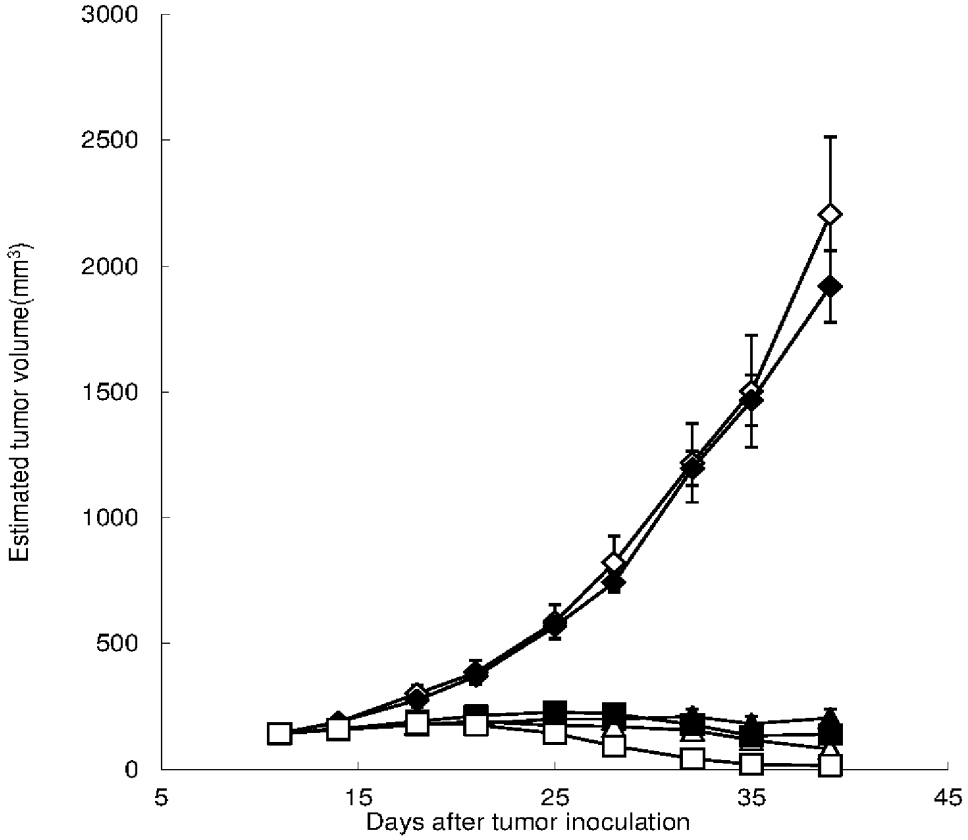
[図17]


5000
4000
3000
2000
1000
0
Estimated tumor volume(mm3)
5
15
25
35
45
Days after tumor inoculation

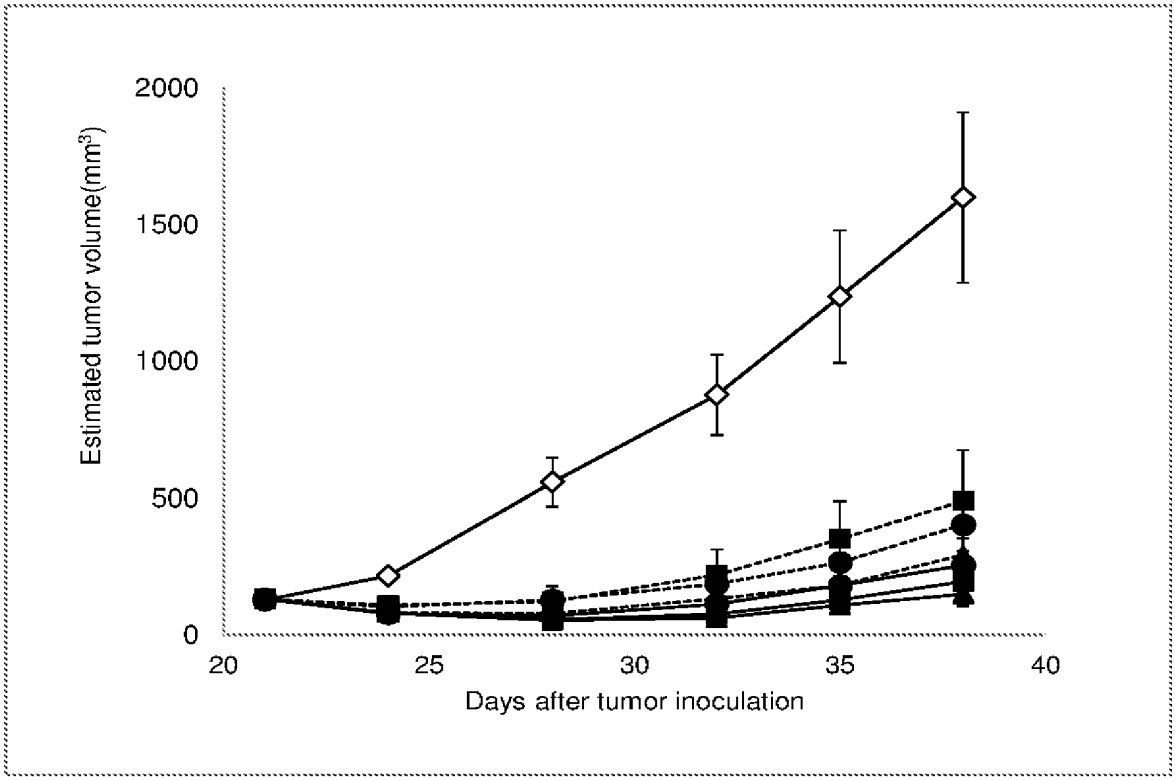
[図18]


2000
1500
1000
500
0
Estimated tumor volume (mm3)
15
25
35
45
55
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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006178

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.
Y A	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	1-30,33-52 31-32
Y A	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	1-30,33-52 31-32
Y A	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	1-30,33-52 31-32

☒ 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)

OnCusp
Ex. 1038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006178

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	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	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 11-092405 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 April 1999 (06.04.1999), entire text (Family: none)	1-30,33-52 31-32
Y A	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	1-30,33-52 31-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006178

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. ☒ Claims Nos.: 53-54
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 53-54 pertain to therapeutic methods for a human being and thus relate 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. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

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
Y A	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	1-30,33-52 31-32
Y A	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	1-30,33-52 31-32

☑　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）		
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	４Ｂ	４１５５
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

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
Y A	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	1-30,33-52 31-32
Y A	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	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 11-092405 A（第一製薬株式会社）1999.04.06，全文 （ファミリーなし）	1-30,33-52 31-32
Y A	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	1-30,33-52 31-32

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

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　５３－５４　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５３－５４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) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 7 월 10 일 (10.07.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/107024 A1

(51) 국제특허분류:
C07D 403/12 (2006.01) *A61K 39/44* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/000005

(22) 국제출원일: 2014 년 1 월 2 일 (02.01.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0000771 2013 년 1 월 3 일 (03.01.2013) KR
10-2013-0017585 2013 년 2 월 19 일 (19.02.2013) KR
10-2013-0017587 2013 년 2 월 19 일 (19.02.2013) KR
10-2013-0017588 2013 년 2 월 19 일 (19.02.2013) KR
10-2013-0017591 2013 년 2 월 19 일 (19.02.2013) KR

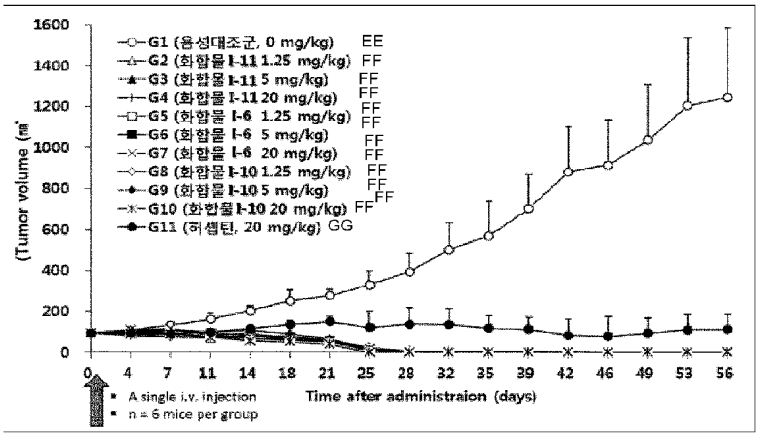
(71) 출원인: **셀트리온 (CELLTRION)** [KR/KR]; 406-840 인천시 연수구 아카데미로 51 번길 19 셀트리온 IP 팀, Incheon (KR).

(72) 발명자: **박영준 (PARK, Young Jun)**; 443-470 경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 713 동 601 호, Gyeonggi-do (KR). **정진교 (JEONG, Jin-kyo)**; 151-770 서울시 관악구 성현로 80, 114 동 202, Seoul (KR). **최영미 (CHOI, Young Mi)**; 446-903 경기도 용인시 기흥구 신구로 22 번길 19, 301 호, Gyeonggi-do (KR). **이민섭 (LEE, Minseob)**; 406-840 인천시 연수구 컨벤시아대로 130 번길 80, 103 동 903 호, Incheon (KR). **김연정 (KIM, Yeon Jung)**; 406-840 인천시 연수구 컨벤시아대로 50, 801 동 803 호, Incheon (KR). **김경석 (KIM, Kyoung Suk)**; 406-761 인천시 연수구 원인재로 212 109 동 1109 호, Incheon (KR). **최준헌 (CHOI, Joon hun)**; 446-581 경기도 용인시 기흥구 강남동로 128, 907 동 1802 호, Gyeonggi-do (KR). **이진서 (LEE, Jin Seo)**; 446-911 경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 455-10, 103 동 2001 호, Gyeonggi-do (KR). **조은주 (CHO, Eun Joo)**; 446-916 경기도 용인시 기흥구 동백5로 21-5, 603 호, Gyeonggi-do (KR). **송현남 (SONG, Hyunnam)**; 445-360 경기도 화성시 경기대로 990, 103 동 702 호, Gyeonggi-do (KR). **박성준 (PARK, Sung Jun)**; 440-330 경기도 수원시 장안구 화산로 187 번길 19, 111 동 2002 호, Gyeonggi-do (KR). **이종협 (LEE, Jonghyoup)**; 446-914 경기도 용인시 기흥구 강남동로 128, 907 동 1802 호, Gyeonggi-do (KR). **이상엽 (LEE, Matthew Sangyup)**; 446-911 경기도 용인시 기흥구 동백8로 126, 2501 동 1401 호, Gyeonggi-do (KR). **이인숙 (LEE, In-Suk)**; 446-903 경기도 용인시 기흥구 구갈로 72 번길, 23, 202 호, Gyeonggi-do (KR). **김준우 (KIM, Joon woo)**; 446-914 경기도 용인시 기흥구 중부대로 788 번길 20, 312 동 703 호, Gyeonggi-do (KR). **홍승서**

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: ANTIBODY-LINKER-DRUG CONJUGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND ANTICANCER DRUG COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) **발명의 명칭** : 항체-링커-약물 결합체, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 항암제 조성물



EE ... Negative control group
FF ... Compound
GG ... Herceptin

(57) **Abstract**: The present invention relates to an antibody-linker-drug conjugate in which an antibody and a cytotoxic drug are conjugated through an enzyme cleavable peptide linker capable of directly binding to a lysine residue of an antibody, a preparation method therefor, and an anticancer drug composition containing the same as an active ingredient.

(57) **요약서**: 본 발명은 항체의 라이신 잔기에 직접 결합할 수 있는 효소-분해형 펩타이드 링커를 통해 항체와 세포독성 약물이 접합된 항체-링커-약물 결합체, 그의 제조방법 및 그를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물을 제공한다.

WO 2014/107024 A1

WO 2014/107024 A1

(HONG, Seung Suh); 135-808 서울시 강남구 언주로 107, 201 동 608 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): 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, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 항체-링커-약물 결합체, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 항암제 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 우수한 항암 활성을 가지는 항체-링커-약물 결합체, 그의 제조방법 및 그를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항체의 라이신 잔기에 직접 결합할 수 있는 효소-분해형 펩타이드 링커를 통해 항체와 세포독성 약물이 접합된 항체-링커-약물 결합체, 그의 제조방법 및 그를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 항체는 특이적 항원에 결합하는 면역학적 단백질로서, 다수의 모노클로날 항체가 현재 항암제로서 개발 중이거나, 암의 치료에 사용되고 있다. 그러나, 거의 모든 항체는 암세포의 증식을 억제하여 암의 진행을 막아 주기는 하지만 암의 치료에는 아주 제한적이다[Sharkey et al., Adv. Drug Del. Rev., 2008, 1407-1420]. 이러한 한계점을 극복하기 위한 대안으로써 항체에 약물을 접합한 항체-약물 결합체(antibody-drug conjugate: ADC)가 새로운 형태의 항체 치료제로서 개발되고 있다[Chari, Acc. Chem. Res., 41(2008), 98-107]. ADC는 세포독성 약물 또는 독소를 이들을 표적 종양세포의 내부에 선택적으로 전달할 수 있는(internalization) 모노클로날 항체(monoclonal antibody: mAb)에 결합(conjugation)시킨 것을 의미한다. 환자에게 투여되면, ADC는 이것의 항체 부분을 통해 표적 세포에 결합하여 세포 내로 전달되며, 이에 따라서 세포독성 약물 또는 독소는 ADC로부터 분리되어 그 자체의 효능을 나타내게 된다[Hamblett et al., Clin. Cancer Res., 10:7063-7070, October 15, 1999].

[4] ADC의 제조를 위해 항체와 세포독성 약물을 효과적으로 접합하기 위해서는 적당한 형태의 링커(linker)를 이용하는 방법이 보편적이다. 이때 사용되는 링커의 대표적인 예로는 히드라존, 디설파이드, 펩타이드 링커 등이 있다. ADC가 효과적으로 작용하기 위해서는 기본적으로 ADC의 세 가지 구성요소인 mAb, 링커 및 세포독성 약물 모두 일정 수준 이상의 기능을 발휘해야 한다[Chari, Acc. Chem. Res., 41(2008), 98-107].

[5] 미국특허 제6,214,345호에는 특정한 리소좀 내에 존재하는 단백질 분해효소인 카텝신(cathepsin)에 의하여 분해되는 효소-분해형(enzyme cleavable) 펩타이드 링커를 이용해 독소루비신, 탁솔 등 세포독성 약물을 항체에 결합시킨 ADC가

개시되어 있다. 또한, 미국특허 제7,964,566호에는 같은 효소-분해형 펩타이드 링커를 사용하여 MeVal-Val-Dil-Dap-Norephedrine(MMAE) 및 MeVal-Val-Dil-Dap-Phe(MMAF)와 같은 세포독성 약물을 항체에 결합시킨 ADC가 보고되어 있다.

[6] 종래의 효소-분해형 펩타이드 링커를 이용한 ADC의 제조방법에 따르면, 링커를 항체에 접합하는 방법으로 항체와 디티오트레이톨(dithiothreitol: DTT)와 같은 환원제를 반응시켜 항체에 존재하는 디설파이드 결합으로부터 항체 내 티올기를 생성한 후, 생성된 티올기와 링커를 접합하는 기술을 사용한다. 그러나 환원제를 사용하여 항체의 분자내 디설파이드 결합을 끊는 방식은 필연적으로 항체 구조 자체의 변형이 동반되고, 이로 인해 항체의 항원에 대한 친화력에 나쁜 영향을 줄 수 있다. 또한 환원 반응 시 항체의 부분적인 분해를 동반하여 최종 ADC의 정제를 어렵게 하는 요인이 되기도 한다. 아울러 반응 중에 항체가 쉽게 집합체를 형성(aggregation)하여 최종 ADC의 수율이 낮아지는 문제점도 있다.

[7] 또한, 항체의 분자내 디설파이드 결합을 환원시켜 티올기를 생성하는 대신에, 2-이미노티오란(Traut's reagent)와 같은 티올기 생성 시약과 항체의 라이신 잔기의 아미노기를 반응시켜 티올기를 생성할 수도 있는 것으로 알려져 있으나, 이 경우에는 항체에 결합된 티올기 생성 시약의 개수가 0 에서 수 개까지 다양한 분포를 보이고, 생성된 티올기와 링커를 접합시킬 때 같은 항체 내에 링커가 결합된 티올기와 링커가 결합되지 않은 티올기가 혼재하게 되는 결과가 초래된다. 따라서 제조된 ADC는 링커가 결합되지 않은 불필요한 티올기의 존재, 티올기 생성 시약으로부터 비롯된 잔기 등으로 인해 ADC의 성능, 특히 생체 내에서 약물동력학이 좋지 않은 문제점을 가지고 있다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명자들은 상기한 바와 같은 목적하지 않은 항체의 구조적 변형 없이 세포독성 약물이 항체에 접합된 ADC를 개발하고자 예의 연구 검토한 결과, 항체의 라이신 잔기에 직접 결합할 수 있는 효소-분해형 펩타이드 링커를 사용하여 종래의 펩타이드 링커의 문제점을 극복할 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하게 되었다.

[10] 따라서, 본 발명의 한 목적은 항체의 라이신 잔기에 직접 결합할 수 있는 효소-분해형 펩타이드 링커를 통해 항체와 세포독성 약물이 접합된 항체-링커-약물 결합체를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체-링커-약물 결합체를 고수율로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체-링커-약물 결합체를 포함하는 항암제

조성물을 제공하는 것이다.

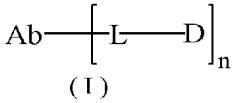
[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명은 하기 화학식 I, I-1, I-2, I-3 또는 I-4의 항체-링커-약물 결합체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다:

[15]

[16] [화학식 I]

[17] 

(I)

[18] 상기 식에서,

[19] Ab는 항체이고,

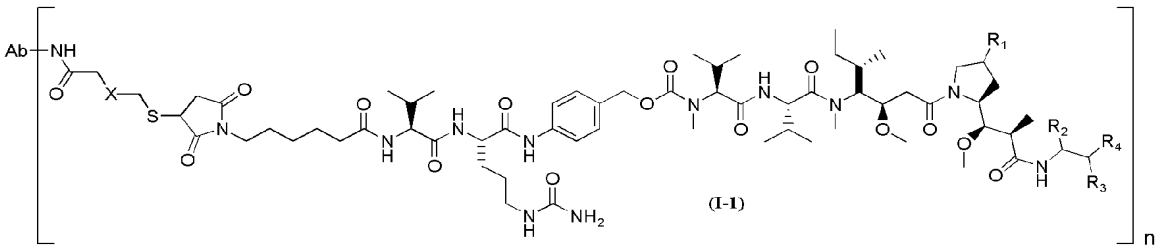
[20] L은 링커이며,

[21] D는 약물이고,

[22] n은 1 내지 5이다.

[23]

[24] [화학식 I-1]

[25] 

(I-1)

[26] 상기 식에서,

[27] Ab는 항체이고,

[28] X는 C_1-C_8의 알킬기 또는 C_3-C_6의 시클로알킬기이며,

[29] R_1은 수소, 히드록시, C_1-C_4의 알콕시기 또는 옥소(=O)이고,

[30] R_2는 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이며,

[31] R_3는 수소, 히드록시, C_1-C_4의 알콕시기, 아미노, 옥소(=O) 또는 히드록시이미노(=N-OH)이며,

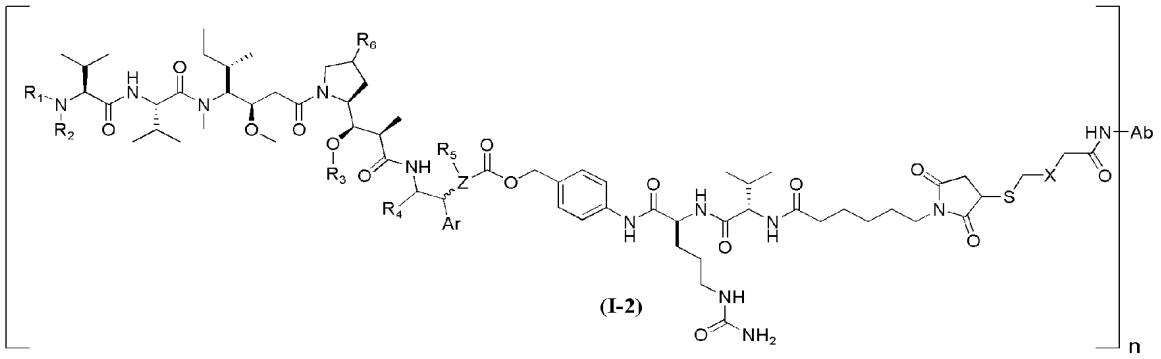
[32] R_4는 아릴기이고,

[33] n은 1 내지 5이다.

[34]

[35] [화학식 I-2]

[36]



[37] 상기 식에서,

[38] Ab는 항체이고,

[39] X는 C_1-C_8의 알킬기 또는 C_3-C_6의 시클로알킬기이며,

[40] R_1, R_2, R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이고,

[41] Ar은 아릴기이며,

[42] Z는 질소 또는 산소이고,

[43] R_5는 Z가 질소일 때 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이고, Z가 산소일 때 존재하지 않으며,

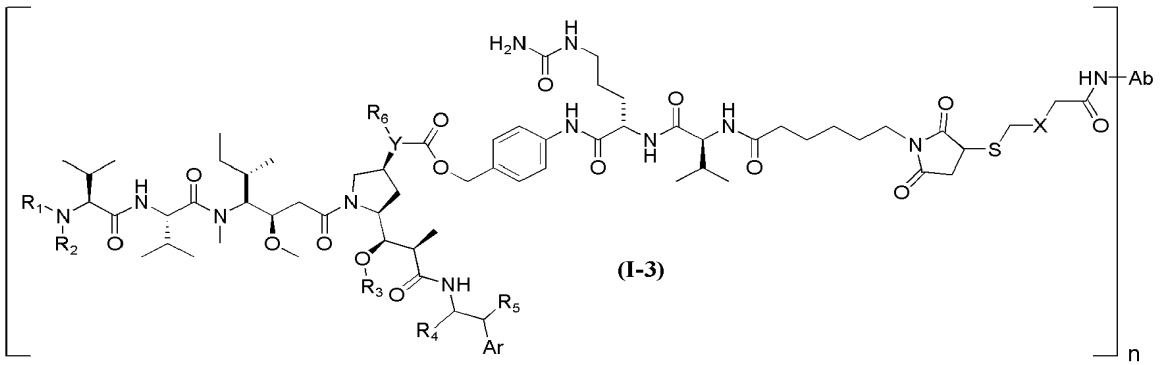
[44] R_6는 수소, 히드록시, C_1-C_4의 알콕시기 또는 옥소(=O)이고,

[45] n은 1 내지 5이다.

[46]

[47] [화학식 I-3]

[48]



[49] 상기 식에서,

[50] Ab는 항체이고,

[51] X는 C_1-C_8의 알킬기 또는 C_3-C_6의 시클로알킬기이며,

[52] R_1, R_2, R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이고,

[53] R_5는 수소, 히드록시, C_1-C_4의 알콕시기, 아미노, 옥소(=O) 또는 히드록시이미노(=N-OH)이며,

[54] Ar은 아릴기이고,

[55] Y는 질소 또는 산소이며,

[56] R_6는 Y가 질소일 때 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이고, Y가 산소일 때 존재하지

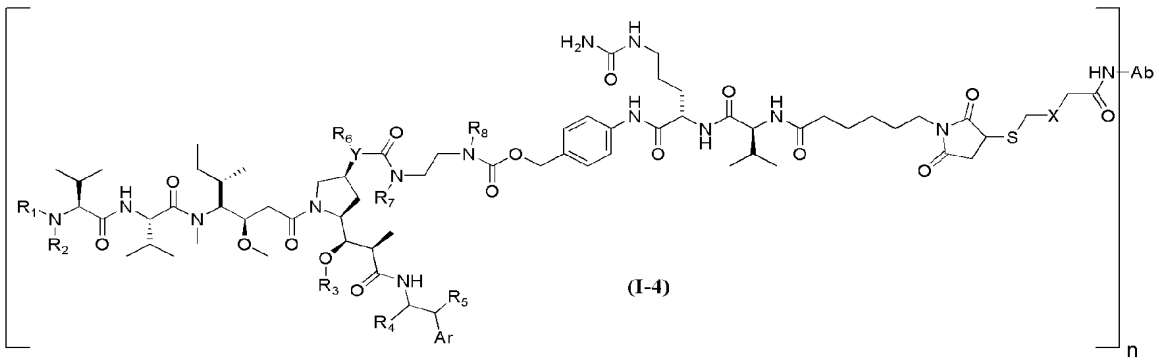
않으며,

[57] n은 1 내지 5이다.

[58]

[59] [화학식 I-4]

[60]



[61] 상기 식에서,

[62] Ab는 항체이고,

[63] X는 C_1-C_8의 알킬기 또는 C_3-C_6의 시클로알킬기이며,

[64] R_1, R_2, R_3, R_4, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이고,

[65] R_5는 수소, 히드록시, C_1-C_4의 알콕시기, 아미노, 옥소(=O) 또는 히드록시이미노(=N-OH)이며,

[66] Ar은 아릴기이고,

[67] Y는 질소 또는 산소이며,

[68] R_6는 Y가 질소일 때 수소 또는 C_1-C_4의 알킬기이고, Y가 산소일 때 존재하지 않으며,

[69] n은 1 내지 5이다.

[70]

[71] 본 명세서에서 C_1-C_8의 알킬기는 탄소수 1 내지 8개로 구성된 직쇄형 또는 분지형 탄화수소를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, n-펜틸, n-옥틸 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[72] 본 명세서에서 C_3-C_6의 시클로알킬기는 탄소수 3 내지 6개로 구성된 고리형 탄화수소를 의미하며, 예를 들어 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[73] 본 명세서에서 C_1-C_4의 알콕시기는 탄소수 1 내지 4개로 구성된 직쇄형 또는 분지형 알콕시기를 의미하며, 메톡시, 에톡시, n-프로판옥시 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[74] 본 명세서에서 C_1-C_4의 알킬기는 탄소수 1 내지 4개로 구성된 직쇄형 또는 분지형 탄화수소를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, t-부틸 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[75] 본 명세서에서 아릴기는 아로메틱기와 헤테로아로메틱기 및 그들의