明　細　書

発明の名称 ： 抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲート

技術分野

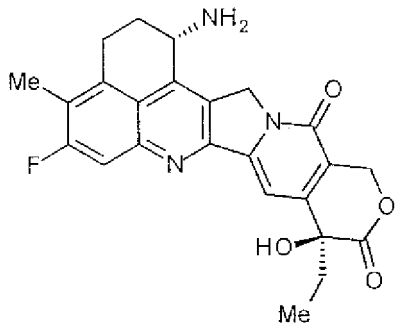
[0001] 本発明は、抗ＨＥＲ２抗体と抗腫瘍性薬物とをリンカー構造部分を介して結合させた、抗腫瘍薬として有用な抗体－薬物コンジュゲートに関する。

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、細胞毒性を有す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（登録商標；ゲムツズマブオゾガマイシン）が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（登録商標；ブレンツキシマブベドティン）が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）。この化合物は、現在臨床で用いられているイリノテカンとは異なり、抗腫瘍効果の発現には酵素による活性化を必要としない。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強いトポイソメラーゼI阻害活性が観察され、in vitroで種々の癌細胞に対して、より強い殺細胞活性が認められた。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が認められた。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が認められたが、臨床試験が行われたものの上市には至っていない（非特許文献５～１０参照）。エキサテカンがADCとして有効に作用するかについては明らかではなかった。

[0006] DE-310は、生分解性のカルボキシメチルデキストランポリアルコールポリマーにエキサテカンを、GGFGペプチドスペーサーを介して結合させた複合体である（特許文献３）。エキサテカンを高分子プロドラッグ化することによって、高い血中滞留性を保持させ、さらに腫瘍新生血管の透過性の亢進と腫瘍組織滞留性を利用して、受動的に腫瘍部位への指向性を高めたものである。DE-310は、酵素によるペプチドスペーサーの切断によって、活性本体であるエキサテカン、及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、その結果薬物動態が改善される。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、ここに含まれるエキサテカンの総量がエキサテカン単剤の投与時よりも減少しているのにも拘らず、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て有効例も確認され、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。その一方、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様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。

[0007] DE-310の関連化合物として、-NH-$(CH_2)_4$-C(=O)-で示される構造部分を-GGFG-スペーサーとエキサテカンの間に挿入し、-GGFG-NH-$(CH_2)_4$-C(=O)-をスペーサー構造とする複合体も知られているが（特許文献４）、同複合体の抗腫瘍効果については全く知られていない。

[0008] ＨＥＲ２は、ヒト上皮細胞増殖因子受容体２型関連癌遺伝子として同定された代表的な増殖因子受容体型の癌遺伝子産物のひとつであり、分子量１８５ｋＤａのチロシンキナーゼドメインを持つ膜貫通型受容体蛋白である（非特許文献１５）。ＨＥＲ２のＤＮＡ配列及びアミノ酸配列は公的データベース上に公開されており、例えば、Ｍ１１７３０（Ｇｅｎｂａｎｋ）、ＮＰ＿００４４３９．２（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。

ＨＥＲ２（ｎｅｕ，ＥｒｂＢ－２）はＥＧＦＲ（epidermal growth factor receptor：上皮増殖因子受容体）ファミリーのひとつであり、ホモダイマー或は他のＥＧＦＲ受容体であるＨＥＲ１（ＥＧＦＲ，ＥｒｂＢ－１）、ＨＥＲ３（ＥｒｂＢ－３）、ＨＥＲ４（ＥｒｂＢ－４）とのヘテロダイマー形成（非特許文献１６－１８）によって細胞内チロシン残基が自己リン酸化されて活性化することにより、正常細胞及び癌細胞において細胞の増殖・分化・生存に重要な役割を果たしていることが知られている（非特許文献１９、２０）。ＨＥＲ２は乳癌、胃癌、卵巣癌等様々な癌種において過剰発現しており（非特許文献２１－２６）、乳癌においては負の予後因子であることが報告されている（非特許文献２７、２８）。

[0009] トラスツズマブは、組み換えヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体（ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８、ｒｈｕＭＡｂ　ＨＥＲ２、ハーセプチン（登録商標））と称される、マウス抗ＨＥＲ２抗体４Ｄ５（非特許文献２９、特許文献５）のヒト化抗体(特許文献６)である。トラスツズマブは、ＨＥＲ２の細胞外ドメインⅣに特異的に結合し、抗体依存性細胞障害（ＡＤＣＣ）誘導やＨＥＲ２からのシグナル伝達阻害を介して抗癌効果を発揮する（非特許文献３０

、３１）。トラスツズマブはＨＥＲ２を過剰発現した腫瘍に対して高い効果を示すことから（非特許文献３２）、ＨＥＲ２を過剰発現している転移性乳癌患者での治療薬として、米国で１９９９年、我が国において２００１年に上市された。

乳癌におけるトラスツズマブの治療効果は十分に証明されている一方（非特許文献３３）、トラスツズマブに応答するのは、広範囲の従来の抗癌治療を受けたＨＥＲ２を過剰発現した乳癌患者の約１５％と言われ、この集団の約８５％の患者はトラスツズマブ処置に対して応答しないか、応答が貧弱であるのみである。

[0010] したがって、トラスツズマブに対して応答しないか、応答が貧弱であるＨＥＲ２を過剰発現する腫瘍又はＨＥＲ２発現に関連する障害を患っている患者のために、ＨＥＲ２発現に関連する疾病を標的とする治療薬の必要性が認識されており、トラスツズマブにリンカー構造を介して抗腫瘍性薬物を結合したＴ－ＤＭ１（トラスツズマブエムタンシン、カドサイラ（登録商標）；非特許文献３４）やＨＥＲ２の細胞外ドメインＩＩを標的とし、ヘテロダイマー形成を阻害するよう設計されたペルツズマブ（パージェタ（登録商標）；非特許文献３５、特許文献７）が開発された。しかしながら、応答性や活性の強さ、並びに適応範囲は未だ十分ではなく、ＨＥＲ２を標的とする未充足ニーズが存在している。

先行技術文献

特許文献

[0011] 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：国際公開第１９９７/４６２６０号

特許文献4：国際公開第２０００/２５８２５号

特許文献5：米国特許第５６７７１７１号明細書

特許文献6：米国特許第５８２１３３７号明細書

特許文献7：国際公開第０１／００２４４号

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

非特許文献2：Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

非特許文献3：Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

非特許文献4：Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

非特許文献5：Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.

非特許文献6：Mitsui, I., et al., Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-786.

非特許文献7：Takiguchi, S., et al., Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.

非特許文献8：Joto, N. et al., Int J Cancer (1997) 72, 680-686.

非特許文献9：Kumazawa, E. et al., Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.

非特許文献10：De Jager, R., et al., Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.

非特許文献11：Inoue, K. et al., Polymer Drugs in the Clinical Stage, Edited by Maeda et al. (2003) 145-153.

非特許文献12：Kumazawa, E. et al., Cancer Sci (2004) 95, 168-175.

非特許文献13：Soepenberg, O. et al., Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.

非特許文献14：Wente M. N. et al., Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.

非特許文献15：Coussens L, et al., Science. 1985;230(4730):1132-1139.

非特許文献16：Graus-Porta G, et al., EMBO J. 1997;16:1647-1655.

非特許文献17：Karnagaran D, et al., EMBO J. 1996;15:254-264.

非特許文献18：Sliwkowski MX, et al., J Biom Chem. 1994;269:14661-14665.

非特許文献19：Di Fore PP, et al., Science. 1987;237:178-182.

非特許文献20：Hudziak RM, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:7159-7163.

非特許文献21：Hardwick R, et al., Eur. J Surg Oncol. 1997 (23):30-35.

非特許文献22：Korkaya H, et al., Oncogene. 2008;27(47):6120-6130.

非特許文献23：Yano T, et al., Oncol Rep. 2006;15(1):65-71.

非特許文献24：Slamon DJ, et al., Science. 1987;235:177-182.

非特許文献25：Gravalos C, et al., Ann Oncol 19: 1523-1529, 2008.

非特許文献26：Fukushige S et al., Mol Cell Biol 6: 955-958, 1986.

非特許文献27：Slamon DJ, et al. Science. 1989;244:707-712.

非特許文献28：Kaptain S et al., Diagn Mol Pathol 10:139-152, 2001.

非特許文献29：Fendly. et al., Cancer Research 1990(50):1550-1558.

非特許文献30：Sliwkowski MX, et al., Semin Oncol. 1999;26(4,Suppl 12):60-70.

非特許文献31：Hudis CA, et al., N Engl J Med. 357: 39-51, 2007.

非特許文献32：Vogel CL, et al., J Clin Oncol. 2002;20(3):719-726.

非特許文献33：Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996).

非特許文献34：Howard A. et al., J Clin Oncol 29:398-405.

非特許文献35：Adams CW, et al., Cancer Immunol Immunother. 2006;6:717-727.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 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、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が課題となっている。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

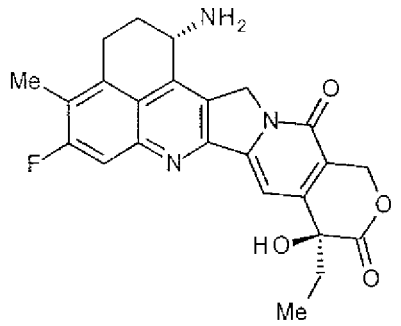
[0014] 本発明者らは、抗ＨＥＲ２抗体が腫瘍細胞を標的にできる抗体であること、すなわち、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞に内在化できる特性、腫瘍細胞に細胞障害性を有する特性、或は腫瘍細胞に対する殺細胞活性等を備えた抗体であることから、抗腫瘍性化合物であるエキサテカンを、リンカー構造部分を介して同抗体に結合させた抗体－薬物コンジュゲートに変換することによって、抗腫瘍性化合物を腫瘍細胞により確実に移動させて当該化合物の抗腫瘍効果を腫瘍細胞で特異的に発揮させることができること、したがって抗腫瘍効果の確実な発揮とともに抗ＨＥＲ２抗体の殺細胞効果の増強が期待できること、さらには抗腫瘍性化合物の投与量を当該化合物の単体投与時よりも減少させることができること、すなわちこれらによって通常細胞への抗腫瘍性化合物の影響を緩和させることができるのでより高い安全性を達成できること、が可能と考えた。

このために本発明者らは特定の構造のリンカーを創出し、このリンカーを介して抗ＨＥＲ２抗体とエキサテカンとを結合させた抗体－薬物コンジュゲートを獲得することに成功し、同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。

[0015] すなわち本願発明は、

［１］次式

[化2]



で示される抗腫瘍性化合物と抗ＨＥＲ２抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

で示される構造のリンカーを介して、抗ＨＥＲ２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によっ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。

[0016] ここで、抗ＨＥＲ２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、$-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基に結合する。

式中、n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^1は、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$を示し、

ここで、n^3は、２から８の整数を示し、

L^2は、$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$又は単結合を示し、

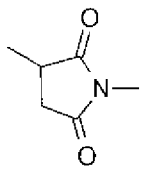
ここで、n^4は、１から６の整数を示し

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^aは、$-O-$又は単結合を示し、

$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

[化3]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２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。

[0017] さらに本願発明は以下の各々に関するものでもある。

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

［３］L^Pが、以下の群から選ばれるペプチド残基である［１］又は［２］に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

-GGF-、

-DGGF-、

-(D-)D-GGF-、

-EGGF-、

-GGFG-、

-SGGF-、

-KGGF-、

-DGGFG-、

-GGFGG-、

-DDGGFG-、

-KDGGFG-、及び

-GGFGGGF-；

ここで『(D-)D』はD-アスパラギン酸を示す。

［４］L^Pが、４個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である［１］又は［２］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［５］L^Pが、テトラペプチド残基の-GGFG-である［１］～［４］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0018] ［６］n^3が２から５の整数であって、L^2が単結合である［１］～［５］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［７］n^3が２から５の整数であって、L^2が-NH-$(CH_2CH_2-O)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-で

あり、n^4が２又は４である［１］～［５］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［８］$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、４から７原子の鎖長を有する部分構造である［１］～［７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［９］$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、５又は６原子の鎖長を有する部分構造である［１］～［７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１０］$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は

$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$である［１］～［９］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１１］$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、又は

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

である［１］～［９］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0019] ［１２］$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１］～[９]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

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

、

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

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

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

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

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

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

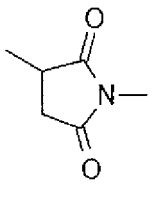
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

[0020] ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

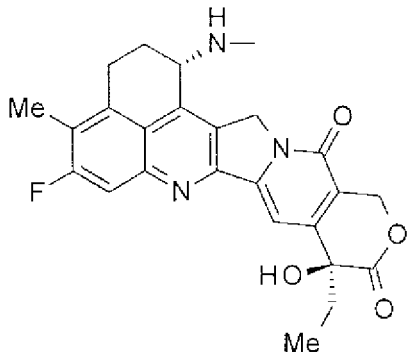
[化4]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２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。

-(NH-DX)は次式：

[化5]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。

[0021] ［１３］$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１］～［９］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

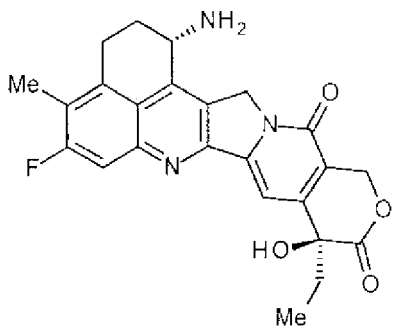
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、

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

[0022] ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-、-(NH-DX)、及び-GGFG-は、上記の通りである。

[0023] ［１４］次式

[化6]



で示される抗腫瘍性化合物と抗ＨＥＲ２抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

で示される構造のリンカーを介して、抗ＨＥＲ２抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して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ＨＥＲ２抗体はL^1の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は$-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基に結合する。

式中、n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^1は、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$を示し、

ここで、n^3は、２から８の整数を示し、

L^2は、$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$又は単結合を示し、

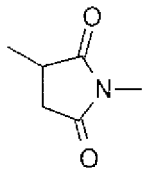
ここで、n^4は、１から６の整数を示し、

L^Pは、-GGFG-のテトラペプチド残基を示し、

L^aは、-O-又は単結合を示し、

$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

[化7]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２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。

[0024] ［１５］n^1が３であり、n^2が０であり、n^3が２であり、L^2が$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$であって、$n^4$が２であり、$L^a$が単結合であるか、

n^1が１であり、n^2が１であり、n^3が５であり、L^2が単結合であり、L^aが-O-であるか、又は

n^1が２であり、n^2が１であり、n^3が５であり、L^2が単結合であり、L^aが-O-で

ある、［１４］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１６］n^3が２又は５であって、L^2が単結合である［１４］又は［１５］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１７］n^3が２又は５であって、L^2が-NH-$(CH_2CH_2O)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-であり、n^4が２又は４である［１４］又は［１５］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［１８］-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-が、

-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［１４］～［１７］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0025] ［１９］-L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１４］～[１８]のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

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

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

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

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

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

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

)、

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

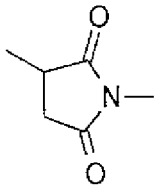
-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

[0026] ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

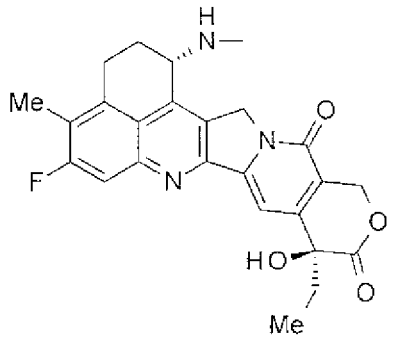
[化8]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２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。

-(NH-DX)は次式：

[化9]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。

[0027] ［２０］-L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-に薬物を結合させた薬物

－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である［１４］～［１８］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

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

ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-、-(NH-DX)、及び-GGFG-は、上記の通りである。

[0028] ［２１］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である［１］～［２０］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２２］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である［１］～［２０］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［２３］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である［１］～［２０］のいずれか一に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0029] ［２４］［１］～［２３］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

［２５］［１］～［２３］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。

［２６］肺癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌、乳癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、陰茎癌、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞種、骨髄腫、又は肉腫に適用するための［２５］に記載の抗腫瘍薬及び/又は

抗癌薬。

［２７］［１］～［２３］のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

［２８］肺癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌、乳癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、陰茎癌、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞種、骨髄腫、又は肉腫に適用するための［２７］に記載の医薬組成物。

［２９］［１］～［２３］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。

[0030] ［３０］次式で示される化合物：

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-(NH-DX)

を抗ＨＥＲ２抗体又はその反応性誘導体と反応させ、該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によって薬物－リンカー部分を該抗体に結合させることを特徴とする抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

[0031] 式中、n^3は、整数の２から８を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2CH_2O)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-又は単結合を示し、

ここで、n^4は、１から６の整数を示し、

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

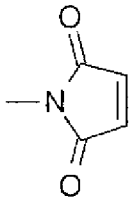
n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^aは、-O-又は単結合を示し、

(maleimid-N-yl)-は、次式

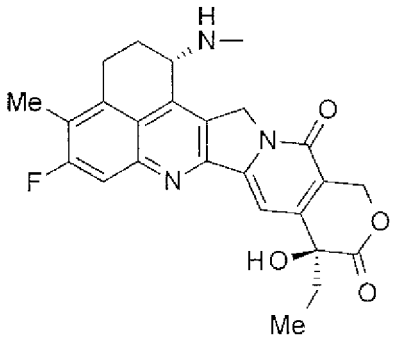
[化10]



で示される、窒素原子が結合部位となっている基である。

-(NH-DX)は、次式

[化11]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0032] ［３１］薬物－リンカー部分を抗ＨＥＲ２抗体に結合させる方法が、該抗体を還元処理して反応性誘導体に変換する方法である［３０］に記載の製造方法。

[0033] ［３２］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である［３０］又は［３１］に記載の製造方法。

［３３］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である［３０］又は［３１］に記載の製造方法。

［３４］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である［３０］又は［３１］に記載の製造方法。

［３５］［３０］～［３４］のいずれかの製造方法によって得られる抗体－薬物コンジュゲート。

[0034] ［３６］抗ＨＥＲ２抗体を還元条件で処理した後に以下の群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、該抗体のヒンジ部のスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

、

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

)、

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

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

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

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

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

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

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

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

、

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

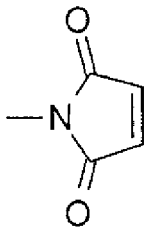
(maleimid-N-yl)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

[0035] ここで、(maleimid-N-yl)-は、次式

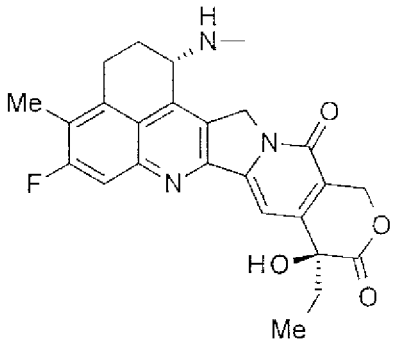
[化12]



で示される、窒素原子が結合部位となっている基である。

-(NH-DX)は、次式

[化13]



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。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。

[0036] ［３７］抗ＨＥＲ２抗体を還元条件で処理した後に以下の群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、該抗体のヒンジ部のスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体－薬物コンジュゲート：

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

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

及び

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

。

ここで、(maleimid-N-yl)-、-(NH-DX)、及び-GGFG-は、上記の通りである

。

[0037] ［３８］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である［３６］又は［３７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［３９］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である［３６］又は［３７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

［４０］選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である［３６］又は［３７］に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

発明の効果

[0038] 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ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートによって、優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することができる。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体重鎖のアミノ酸配列（配列番号１）を示す。

[図2]ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

[図3]抗体－薬物コンジュゲート（２７）又はトラスツズマブによるヒト乳癌株ＫＰＬ－４細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図4]抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２８）、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト胃癌株ＮＣＩ－Ｎ８７細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図5]抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２９）、（３０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト乳癌株ＪＩＭＴ－１細胞皮

下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図6]抗体－薬物コンジュゲート（３１）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト膵臓癌株Ｃａｐａｎ－１細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図7]抗体－薬物コンジュゲート（５０）によるヒト胃癌株ＮＣＩ－Ｎ８７細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図8]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト乳癌株ＳＴ２２５細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図9]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト乳癌株ＳＴ９１０細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図10]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト大腸癌株ＣＴＧ－０４０１細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図11]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト非小細胞肺癌株ＣＴＧ－０８６０細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図12]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト胆管癌株ＣＴＧ－０９２７細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日

数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図13]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト食道癌株ＣＴＧ－０１３７細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[図14]抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンによるヒト卵巣癌株ＳＫ－ＯＶ－３細胞皮下移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を示す図である。図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

発明を実施するための形態

[0040] 以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これによって本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0041] 本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートは、抗ＨＥＲ２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。

[0042] ［抗体］

本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートに使用される抗ＨＥＲ２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。抗体が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。

抗ＨＥＲ２抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、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、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性、そして腫瘍細胞に対する殺細胞活性等を備えており、抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体－薬物コンジュ

ゲートとすることができる。

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（Bio Techniques 28:162-165, January 2000)を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテテリア毒素の触媒領域とプロテインＧとのリコンビナント複合蛋白質も使用可能である。

抗体の抗腫瘍活性は、in vitroでは、細胞の増殖の抑制活性を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。

抗体－薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞障害性を腫瘍細胞において特異的・選択的に発揮させる目的からは、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重要であり、好ましい。

[0043] 抗ＨＥＲ２抗体は、公知の手段によって取得することができる。例えば、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。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、或は抗原を発現している細胞株、を動物に免疫する方法を用いることによっても抗体を取得できる。

[0044] 本発明で使用できる抗ＨＥＲ２抗体は、特に制限はないが、例えば、以下の特性を有するものが望ましい。

（１）以下の特性を有することを特徴とする抗ＨＥＲ２抗体；

（ａ）ＨＥＲ２に特異的に結合する。

（ｂ）ＨＥＲ２と結合することによってＨＥＲ２発現細胞に内在化する活性を有する。

（２）ＨＥＲ２の細胞外ドメインに結合する上記（１）に記載の抗体。

（３）モノクローナル抗体である上記（１）又は（２）に記載の抗体。

（４）抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性及び/又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性を有する上記（１）乃至（３）のいずれかに記載の抗体。

（５）マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、又はヒト化モノクローナル抗体である、上記（１）乃至（４）のいずれかに記載の抗体。

（６）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号２に記載

のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記（１）乃至（５）のいずれかに記載の抗体。

（７）重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している上記（１）乃至（６）のいずれかに記載の抗体。

（８）配列番号１においてアミノ酸番号１乃至４４９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号２においてアミノ酸番号１乃至２１４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる上記（７）に記載の抗体。

（９）上記（１）乃至（８）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。

[0045] 以下に、本発明において使用される抗ＨＥＲ２抗体について説明する。

本明細書において、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

本明細書において、「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。

本明細書において、「ポリペプチド」「蛋白質」「蛋白」は区別せずに用いている。

本明細書において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

本明細書において、「ＨＥＲ２」という語は、ＨＥＲ２蛋白と同じ意味で用いている。

本明細書において、抗ＨＥＲ２抗体とは、特に制限はないが、ペルツズマブ（国際公開０１／００２４５号）、トラスツズマブ（米国特許第５８２１３３７号）等を挙げることができるが、トラスツズマブが好ましい。但し、ＨＥＲ２に特異的に結合する、より好ましくは、ＨＥＲ２と結合することに

よってＨＥＲ２発現細胞に内在化する活性を有する抗ＨＥＲ２抗体であればこれに限らない。

本明細書において、「トラスツズマブ」はＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８、ｒｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８と呼ばれることもあり、配列番号１（図１）においてアミノ酸番号１乃至４４９に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号２（図２）においてアミノ酸番号１乃至２１４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化抗体である。

本明細書において、「特異的に結合」という語は、非特異的な吸着ではない結合を意味する。結合が特異的であるか否かの判定基準としては、例えば、解離定数（以下、「ＫＤ」）を挙げることができる。好適な抗体のＨＥＲ２蛋白に対するＫＤ値は１×１０$^{-5}$Ｍ以下、５×１０$^{-6}$Ｍ以下、２×１０$^{-6}$Ｍ以下、又は１×１０$^{-6}$Ｍ以下；より好適には５×１０$^{-7}$Ｍ以下、２×１０$^{-7}$Ｍ以下、又は１×１０$^{-7}$Ｍ以下；より一層好適には５×１０$^{-8}$Ｍ以下、２×１０$^{-8}$Ｍ以下、又は１×１０$^{-8}$Ｍ以下；最適には５×１０$^{-9}$Ｍ以下、２×１０$^{-9}$Ｍ以下、又は１×１０$^{-9}$Ｍ以下である。ＨＥＲ２蛋白と抗体との結合は、Ｓｕｒｆａｃｅ　Ｐｌａｓｍｏｎ　Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ法、ＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ法等公知の方法を用いて測定することができる。

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。本明細書においては、抗体のＣＤＲについて、重鎖のＣＤＲを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖のＣＤＲを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定して

いる。

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

[0046] １．ＨＥＲ２

ＨＥＲ２はヒト上皮細胞増殖因子受容体２型関連癌遺伝子として同定された代表的な増殖因子受容体型の癌遺伝子産物のひとつであり、分子量１８５ｋＤａのチロシンキナーゼドメインを持つ膜貫通型受容体蛋白である。ＨＥＲ１（ＥＧＦＲ，ＥｒｂＢ－１）、ＨＥＲ２（ｎｅｕ，ＥｒｂＢ－２）、ＨＥＲ３（ＥｒｂＢ－３）、ＨＥＲ４（ＥｒｂＢ－４）からなるＥＧＦＲファミリーのひとつであり、ホモ或は他のＥＧＦＲであるＨＥＲ１、ＨＥＲ３、又はＨＥＲ４とのヘテロダイマー形成により細胞内チロシン残基が自己リン酸化されて活性化することにより、正常細胞及び腫瘍細胞において細胞の増殖・分化・生存に重要な役割を果たすことが知られている。

本発明で用いるＨＥＲ２蛋白は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス等）のＨＥＲ２発現細胞から直接精製して使用するか、或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、ＨＥＲ２をin vitroにて合成する、或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、ＨＥＲ２　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、或は他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換してＨＥＲ２を発現させることによって、該蛋白質を得ることがで

きる。また、前記の遺伝子操作によるＨＥＲ２発現細胞、或はＨＥＲ２を発現している細胞株をＨＥＲ２蛋白として使用することも可能である。

ＨＥＲ２のＤＮＡ配列及びアミノ酸配列は公的データベース上に公開されており、例えば、Ｍ１１７３０（Ｇｅｎｂａｎｋ）、ＮＰ＿００４４３９．２（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。

また、上記ＨＥＲ２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ＨＥＲ２に含まれる。

ヒトＨＥＲ２蛋白は、Ｎ末端２２アミノ酸残基から成るシグナル配列、６３０アミノ酸残基から成る細胞外ドメイン、２３アミノ酸残基から成る細胞膜貫通ドメイン、５８０アミノ酸残基から成る細胞内ドメインで構成されている。

[0047] ２．抗ＨＥＲ２抗体の製造

本発明のＨＥＲ２に対する抗体は、例えば、この分野で通常実施される方法に従って、ＨＥＲ２又はＨＥＲ２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ＨＥＲ２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ＨＥＲ２、ラットｐ１８５ｎｅｕ等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ＨＥＲ２に結合する抗体とヒトＨＥＲ２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、ＨＥＲ２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ＨＥＲ２はＨＥＲ２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、ＨＥＲ２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ＨＥＲ２を精製すればよい。

また、上記の遺伝子操作によるＨＥＲ２発現細胞、或はＨＥＲ２を発現している細胞株をＨＥＲ２蛋白として使用することも可能である。抗ＨＥＲ２抗体は、公知の手段によって取得することができる。以下、具体的にＨＥＲ２に対する抗体の取得方法を説明する。

[0048] （１） 抗原の調製

抗ＨＥＲ２抗体を作製するための抗原としては、ＨＥＲ２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、或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。

ＨＥＲ２は、ヒトの腫瘍組織或は腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、ＨＥＲ２をin vitroにて合成する、或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、ＨＥＲ２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、或は他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換してＨＥＲ２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ＨＥＲ２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。

ＨＥＲ２のｃＤＮＡは、例えばＨＥＲ２のｃＤＮＡを発現しているｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、ＨＥＲ２　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（ＰＣＲ；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；ＡＴＣＣ：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）、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、この分野で通常実施される方法に従って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。或は、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。

上記に述べた形質転換体自体を抗原として使用することも可能である。また、ＨＥＲ２を発現する細胞株を抗原として使用することも可能である。この様な細胞株としては、ヒト乳癌株ＳＫ－ＢＲ－３、ＢＴ－４７４、ＫＰＬ－４、又はＪＩＭＴ－１、ヒト胃癌株ＮＣＩ－Ｎ８７、及びヒト卵巣癌株ＳＫ－ＯＶ－３を挙げることができるが、ＨＥＲ２を発現する限り、これらの細胞株に限定されない。

[0049] （２） 抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体の製造

ＨＥＲ２と特異的に結合する抗体の例として、ＨＥＲ２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、一般に下記の様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、又は抗原発現細胞の調製

（ｂ）抗原を動物に注射することによって免疫した後、血液を採取して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）この様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、或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。

[0050] （ａ）抗原の精製

抗原としては、前記した様な方法で調製したＨＥＲ２又はその一部を使用することができる。

また、ＨＥＲ２発現組換え体細胞によって調製した膜画分、又はＨＥＲ２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。

さらに、ＨＥＲ２発現細胞株を抗原として使用することもできる。

[0051] （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、或はカリミョウバンの様な助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。この他に、抗原発現細胞を免疫原として実験動物に免疫する方法もある。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法で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、日本クレア株式会社、日本チャールス・リバー株式会社等の実験動物飼育販売業者より入手することができる。

被免疫動物としては、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、これらの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。

ＨＥＲ２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，ＩＩＩｉｎｏｉｓ（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、又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１～４週間後、さらに好ましくは１～３週間後に行う。免疫原が細胞の場合には、１×１０^{6}乃至１×１０^{7}個の細胞を使用する。

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。免疫原が細胞の場合には、１×１０^{6}乃至１×１０^{7}個の細胞を使用する。

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、以下に記載する様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（ＢＳＡ）によって覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

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

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

[0052] （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－Ａ１

２（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、ＡＴＣＣ等から入手することができる。

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

[0053] （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。

その様な方法として、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。

[0054] （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。

[0055] （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ＨＥＲ２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。

[0056] （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、或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）、或はＮｕ／Ｎｕマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることによって、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

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

例えば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、Ｔ細胞を不活性化した後、２０日後に10^6～10^7個のハイブリドー

マ・クローン細胞を、血清を含まない培地中に浮遊（０．５ｍｌ）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水がたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法によって、培養液中に比べて約１００倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

上記方法によって得たモノクローナル抗体は、例えばＷｅｉｒ，Ｄ．Ｍ．：Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．Ⅰ，ⅠⅠ，ⅠⅠⅠ，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ 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、ＨＥＲ２に対して高い抗原特異性を有する。本発明のモノクローナル抗体としては、特に制限はないが、マウスモノクローナル抗体４Ｄ５（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １０４６３）を挙げることができる。

[0057] （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、（ｇ）の工程で得られた抗ＨＥＲ２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。この様な抗体の一例として、（ｇ）の工程で得られた抗ＨＥＲ２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。新たに作製されたモノクローナル抗体が、前記抗ＨＥＲ２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、前記抗ＨＥＲ２抗体のＨＥＲ２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、前記抗ＨＥＲ２抗体とＨＥＲ２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抗ＨＥＲ２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前記抗ＨＥＲ２抗体と同等の抗原結合能又は生物活性を有していることが強く期待される。

[0058] （３） その他の抗体

本発明の抗体には、上記ＨＥＲ２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）。本発明のキメラ抗体としては、特に制限はないが、ヒトＩｇＧ１又はＩｇＧ２の重鎖定常領域を含むキメラ抗体４Ｄ５を挙げることができる。

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の配列に加えて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（国際公開第９０／０７８６１号）、遺伝子変換突然変異誘発（ｇｅｎｅ　ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）ストラテジーを用いてヒト化した抗体（米国特許第５８２１３３７号）を挙げることができる。

[0059] なお、本明細書における「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。

[0060] また、本明細書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＝アスパラギン酸、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。

[0061] 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生物活性を有する抗体を選択することが可能である。この様な相同性は、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生物活性を有する抗体を選択することが可能である。なお、本明細書における「相同性」は「同一性」と同じ意味で使用している。

[0062] 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．Ｓｃｈａｅｆｆｅｒ, 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。

[0063] 本発明の抗体としては、さらに、ＨＥＲ２に結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗ＨＥＲ２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ＨＥＲ２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。

[0064] この様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として、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、その様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。

[0065] 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（国際公開第９２／０１０４７号、同９２／２０７９１号、同９３／０６２１３号、同９３／１１２３６号、同９３／１９１７２号、同９５／０１４３８号、同９５／１５３８８号；Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９４）１２，ｐ．４３３－４５５；Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３（９），ｐ．１１０５－１１１６）。

[0066] 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。

[0067] 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。この様な本発明の抗体の修飾物は、抗体の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

[0068] 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、国際公開第９９／５４３４２号、同００／６１７３９号、同０２／３１１４０号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が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、また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Ｎ

ＩＨ３Ｔ３（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。

[0069] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリ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ル末端のグリシン、リシンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等）には影響を及ぼさない。したがって、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１又は２のアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれ

ている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端のひと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。

[0070] 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。

[0071] 抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、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、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）活性及び抗体依存性細胞媒介食作用（ＡＤＣＰ）を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する生物活性は、ＨＥＲ２に対する結合活性であり、好ましくはＨＥＲ２と結合することによってＨＥＲ２発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性及び/又はＡＤＣＰ活性を併せ持っていてもよい。

[0072] 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．，Ｃｏｌ

ｄ 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．（ファルマシア株式会社）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。

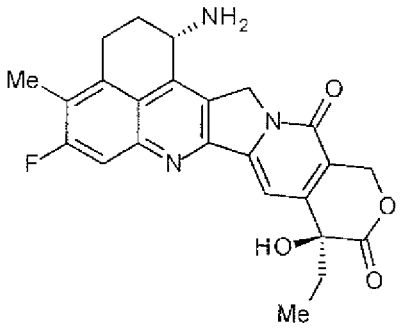
[0073] ［抗腫瘍性化合物］

本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートに結合されている抗腫瘍性化合物について述べる。本発明で使用され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し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未修飾の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

本発明で使用される抗腫瘍性化合物として、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：）

[0074] [化14]



[0075] 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、この様な構造であっても優れた抗腫瘍効果が発揮される優れた化合物である。

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。この様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、いずれの構造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。

[0076] 他の抗腫瘍性化合物として例えば、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、その他の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。

[0077] 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、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。

抗体分子へのエキサテカンの結合数はコントロール可能であり、１抗体あたりの薬物平均結合数として、１から１０個程度のエキサテカンを結合させることができるが、好ましくは２から８個であり、より好ましくは３から８個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体－薬物コンジュゲートを取得することができる。

[0078] ［リンカー構造］

本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートにおいて抗腫瘍性化合物を抗ＨＥＲ２抗体に結合させるリンカー構造について述べる。当該リンカーは、次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

の構造を有しており、抗体はL^1の末端（L^2が結合するのとは反対側の末端）で結合し、抗腫瘍性化合物は$-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基で結合する。

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。

[0079] １．L^1

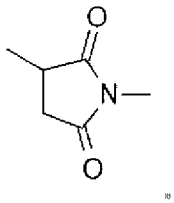
L^1は、

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

の構造で示される。

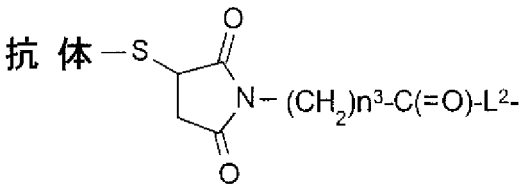
ここで、n^3は、２から８の整数であり、『-(Succinimid-3-yl-N)-』は、次式

[0080] [化15]



[0081] 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ＨＥＲ２抗体への結合部位である。この３位での該抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。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)-$(CH_2)n^3$-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。）。

[0082] [化16]



[0083] 式中、n^3は、２から８の整数であるが、好ましくは２から５である。

[0084] 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)-

等を挙げることができる。

[0085] ２．L^2

L^2は、

$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$

で示される構造であるが、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^4は、１から６の整数であり、好ましくは２から４である。L^2は末端のアミノ基でL^1に結合し、反対の末端のカルボニル基でL^Pと結合する。

[0086] L^2の具体例としては、

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-$、

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

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

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

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

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

等を挙げることができる。

[0087] ３．L^P

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である。すなわち、２から７個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチドの残基によって構成される。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$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のアミノ基に結合する。ここで、『ペプチド残基』或は『オリゴペプチドの残基』とは、２以上のアミノ酸残基からなるペプチドから導かれる基であって、そのＮ末端とＣ末端を結合部位とする２価の基を示す。

[0088] L^Pを構成するアミノ酸は特に限定されることはないが、例えば、L-又はD-アミノ酸であり、好ましくはL-アミノ酸である。また、α－アミノ酸の他、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸、γ－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。

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

エニルアラニン（Phe；F）、チロシン（Tyr；Y）、ロイシン（Leu；L）、グリシン（Gly；G）、アラニン（Ala；A）、バリン（Val；V）、リシン（Lys；K）、シトルリン（Cit）、セリン（Ser；S）、グルタミン酸（Glu；E）、アスパラギン酸（Asp；D）等を挙げることができる。これら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。これ等のアミノ酸から、重複してよく、任意に選択されたアミノ酸の配列を有するL^Pを構築すればよい。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、２から７個でよい。

[0089] L^Pの具体例として、

-GGF-、

-DGGF-、

-(D-)D-GGF-、

-EGGF-、

-GGFG-、

-SGGF-、

-KGGF-、

-DGGFG-、

-GGFGG-、

-DDGGFG-、

-KDGGFG-、

-GGFGGGF-

を挙げることができる。上記の『(D-)D』はD-アスパラギン酸を意味する。本発明の抗体－薬物コンジュゲートの特に好ましいL^Pとして、-GGFG-のテトラペプチド残基を挙げることができる。

[0090] ４．L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-

L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-におけるL^aは、-O-の構造であるか、又は単結合である。n^2は、０から５の整数であるが、好ましくは０から３であり、より好まし

くは０又は１である。

L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-としては以下の構造のものを挙げることができる。

-O-CH_2-C(=O)-、

-O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-O-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-O-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-O-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-CH_2-C(=O)-、

-CH_2CH_2-C(=O)-、

-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-O-C(=O)-。

これらのうちでは、

-O-CH_2-C(=O)-、

-O-CH_2CH_2-C(=O)-、

-O-C(=O)-、

である場合か、L^aが単結合でn^2が０である場合が好ましい。

[0091] リンカーの-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-で示される構造の具体例として、

-NH-CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

-NH-CH_2-O-C(=O)-、

$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-O-C(=O)-$、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-O-C(=O)-$、

等を挙げることができる。

[0092] これらのうちでより好ましくは、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$、

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

である。

[0093] リンカーの$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$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。

[0094] 本発明の抗ＨＥＲ２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、$NH_2-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-(NH-DX)$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と考えられる。本発明の抗体－薬物コンジュゲートから遊離されて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$-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$で示される構造の末端がアミノ基となった構造部分を有する抗腫瘍性誘導体を挙げることができるが、特に好ましいものは次のものである。

$NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、

$NH_2-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、

$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$、

$NH_2-CHCH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$。

なお、$NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$の場合は同分子内にあるアミナール構造が不安定であるため、さらに自己分解して

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

が遊離されることが確認された。これらの化合物は本発明の抗体－薬物コンジュゲートの製造中間体としても好適に用いることができる。

[0095] 薬物をエキサテカンとする本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物－リンカー構造部分［-L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)_{n1}$-L^a-$(CH_2)_{n2}$-C(=O)-(NH-DX)］を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物－リンカー構造部分は、１抗体あたりの平均結合数として、１から１０を結合させればよいが、好ましくは２から８であり、より好ましくは３から８である。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

これらのうちでより好ましくは、次のものである。

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

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

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

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

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

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

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

さらに、好ましくは、次のものである。

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

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

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

[0096] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗ＨＥＲ２抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、これまで述べたリンカー各部において示した好ましい構造のものを結合することで好ましいリンカーを構築することができる。この様なリンカー構造として以下の構造のものを好適に使用することができる。なお構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。

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

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

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

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

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

、

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

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

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

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

NH-CH_2CH_2-C(=O)-、

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

NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

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

H_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-、

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

H_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

これらのうちでより好ましくは、次のものである。

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

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

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

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

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

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

NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-、

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

H_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-。

さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。

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

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

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

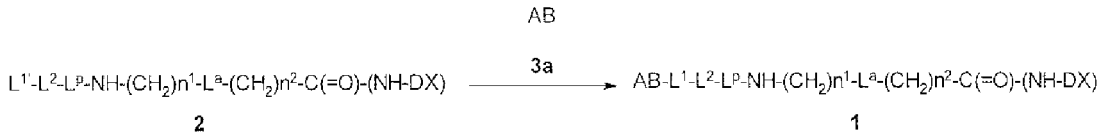
[0097] ［製造方法］

次に、本発明の抗体－薬物コンジュゲート或はその製造中間体の代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式（１）の化合物』、『化合物（１）』等と称する。またこれ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0098] １．製造方法１

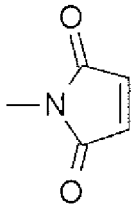
式（１）で示される、チオエーテルを介して抗体と薬物－リンカー構造が結合している抗体－薬物コンジュゲートは、例えば下記の方法によって製造することができる。

[0099] [化17]



[0100] ［式中、ABは、スルフヒドリル基を有する抗体を示し、L^1’は、L^1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）

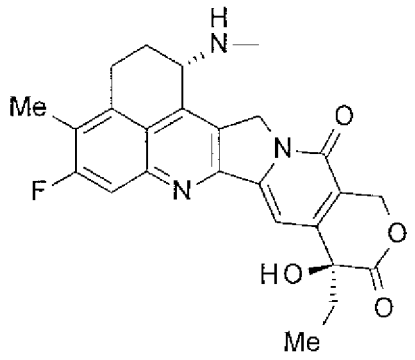
[0101] [化18]



[0102] となった構造（ここで、窒素原子が結合部位である）のリンカーを示すが、具体的には、L^1のうちの-(Succinimid-3-yl-N)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-において-(Succinimid-3-yl-N)-部分がマレイミジル基となった基を示す。また、-(NH-DX)は次式：

[0103]

[化19]



[0104] で示される構造であり、エキサテカンの１位のアミノ基の水素原子１個が除かれて生成する基を示す。]

[0105] 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個の抗体に対して結合した構造として解釈され得るが、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１個に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。

[0106] 後述する方法によって入手しうる化合物（２）と、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を反応させることによって、抗体－薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）は、当業者周知の方法で得ることができる（Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp.56-136, pp.456-493, Academic Press(1996)）。例えば、Ｔｒａｕｔ’ｓ試薬を抗体のアミノ基に作用させる；Ｎ－サクシンイミジル　Ｓ－アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；Ｎ－サクシンイミジル　３－（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、２－メルカプトエタノール、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ)等の還元剤を抗体に作用させて抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元してスルフヒドリル基を生成させる；等の方法を挙げることができるがこれらに限定され

ることはない。

具体的には、還元剤としてＴＣＥＰを、抗体内ヒンジ部ジスルフィド１個当たりに対して０．３乃至３モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内ヒンジ部ジスルフィドが部分的若しくは完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）やジエチレントリアミン５酢酸（ＤＴＰＡ）等を挙げることができる。これらを１ｍＭ乃至２０ｍＭの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的には、抗体を４℃乃至３７℃で１乃至４時間ＴＣＥＰと反応させることで部分的若しくは完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を得ることができる。

ここでスルフヒドリル基を薬物－リンカー部分に付加させる反応を実施することでチオエーテル結合によって薬物－リンカー部分を結合させることができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）１個あたり、２乃至２０モル当量の化合物（２）を使用して、抗体１個当たり２個乃至８個の薬物が結合した抗体一薬物コンジュゲート（１）を製造することができる。具体的には、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に、化合物（２）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム等を用いればよい。反応時のｐＨは５乃至９であり、より好適にはｐＨ７付近で反応させればよい。化合物（２）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）、Ｎ－メチル－２－ピリドン（ＮＭＰ）等の有機溶媒を用いることができる。

化合物（２）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（３ａ）を含む緩衝液に１乃至２０％ｖ／ｖを加えて反応させればよい。反応温度は、０乃至３７℃、より好適には１０乃至２５℃であり、反応時間は、０．５乃至２時間である。反応は、未反応の化合物（２）の反応性をチ

オール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システイン又はＮ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）である。より具体的には、ＮＡＣを、用いた化合物（２）に対して、１乃至２モル当量加え、室温で１０乃至３０分インキュベートすることにより反応を終了できる。

製造した抗体－薬物コンジュゲート（１）は、以下の共通操作によって濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度、及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体－薬物コンジュゲート（１）の同定を行うことができる。

[0107] 共通操作Ａ：抗体又は抗体－薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ（５０，０００ MWCO，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏ．）の容器内に抗体又は抗体－薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機（Ａｌｌｅｇｒａ Ｘ－１５Ｒ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を用いた遠心操作（２０００Ｇ乃至３８００Ｇで５乃至２０分間遠心）にて、抗体又は抗体－薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

[0108] 共通操作Ｂ：抗体の濃度測定

ＵＶ測定器（Ｎａｎｏｄｒｏｐ １０００，Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．）を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる２８０ｎｍ吸光係数（１．３ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$乃至１．８ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）を用いた。

[0109] 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をのせた後、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させ

た画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行った後に、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡを用いて１０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

共通操作Ｃ－２：抗体のバッファー交換

Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５担体を使用したＮＡＰ－２５カラム（Ｃａｔ．Ｎｏ．１７－０８５２－０２，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｊａｐａｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム（５０ｍＭ）及びＥＤＴＡ（２ｍＭ）を含むリン酸緩衝液（５０ｍＭ，ｐＨ６．５；本明細書でＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡと称する）にて平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラム一本につき、抗体水溶液２．５ｍＬをのせた後、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡ３．５ｍＬで溶出させた画分（３．５ｍＬ）を分取した。この画分を共通操作Ａによって濃縮し、共通操作Ｂを用いて抗体濃度の測定を行った後に、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡを用いて２０ｍｇ／ｍＬに抗体濃度を調整した。

[0110] 共通操作Ｄ：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）又はＳｏｒｂｉｔｏｌ（５％）を含む酢酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ５．５；本明細書でＡＢＳと称する）のいずれかの緩衝液でＮＡＰ－２５カラムを平衡化させた。このＮＡＰ－２５カラムに、抗体－薬物コンジュゲート反応水溶液（約１．５ｍＬ）をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びＮＡＰ－２５カラムにのせ、緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計２乃至３回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ）、Ｎ－アセチル－Ｌ－システイン（ＮＡＣ）、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。

[0111] 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（１）

抗体－薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、抗体－薬物コンジュゲート水溶液の２８０ｎｍ及び３７０ｎｍの二波長におけるＵＶ吸光度を測定した後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。

$$A_{280}=A_{D,280}+A_{A,280}=\varepsilon_{D,280}C_D+\varepsilon_{A,280}C_A \quad \text{式（Ｉ）}$$

$$A_{370}=A_{D,370}+A_{A,370}=\varepsilon_{D,370}C_D+\varepsilon_{A,370}C_A \quad \text{式（ＩＩ）}$$

ここで、A_{280}は２８０ｎｍにおける抗体－薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、A_{370}は３７０ｎｍにおける抗体－薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、$A_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体の吸光度を示し、$A_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$A_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、$\varepsilon_{A,280}$は２８０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{A,370}$は３７０ｎｍにおける抗体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、$\varepsilon_{D,370}$は３７０ｎｍにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、C_Aは抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、C_Dは抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。

ここで、$\varepsilon_{A,280}$、$\varepsilon_{A,370}$、$\varepsilon_{D,280}$、$\varepsilon_{D,370}$は、事前に用意した値（計算推定値又は化合物のＵＶ測定から得られた実測値）が用いられる。例えば、$\varepsilon_{A,280}$は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423）によって推定することができる。$\varepsilon_{A,370}$は、

通常、ゼロである。実施例において、トラスツズマブのモル吸光係数は、$\varepsilon_{A,280}$＝２１５４００（計算推定値）及び$\varepsilon_{A,370}$＝０を用いた。$\varepsilon_{D,280}$及び$\varepsilon_{D,370}$は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。実施例における薬物リンカーのモル吸光係数は、特に断りのない限り、$\varepsilon_{D,280}$＝５０００（実測平均値）、$\varepsilon_{D,370}$＝１９０００（実測平均値）を用いた。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（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）に代入して連立方程式を解くことによって、C_A及びC_Dを求めることができる。さらにC_DをC_Aで除することで１抗体あたりの薬物平均結合数が求めることができる。

[0112] 共通操作Ｆ：抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（２）

抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の共通操作Ｅに加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分析によっても求めることができる。

［Ｆ－１．ＨＰＬＣ分析用サンプルの調製（抗体－薬物コンジュゲートの還元）］

抗体－薬物コンジュゲート溶液（約１ｍｇ／ｍＬ、６０μＬ）をジチオトレイトール（ＤＴＴ）水溶液（１００ｍＭ、１５μＬ）と混合する。混合物を３７℃で３０分インキュベートすることで、抗体－薬物コンジュゲートのＬ鎖及びＨ鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、ＨＰＬＣ分析に用いる。

［Ｆ－２．ＨＰＬＣ分析］

ＨＰＬＣ分析を、下記の測定条件にて行う。

ＨＰＬＣシステム：Ａｇｉｌｅｎｔ １２９０ ＨＰＬＣシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：２８０ｎｍ）

カラム：ＰＬＲＰ－Ｓ（２．１×５０ｍｍ、８μｍ、１０００Å；Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐ／Ｎ ＰＬ１９１２－１８０２）

カラム温度：８０℃

移動相Ａ：０．０４％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）水溶液

移動相Ｂ：０．０４％ＴＦＡを含むアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム：２９％－３６％（０分－１２．５分）、３６％－４２％（１２．５－１５分）、４２％－２９％（１５分－１５．１分）、２９％－２９％（１５．１分－２５分）

サンプル注入量：１５μＬ

［Ｆ－３．データ解析］

〔Ｆ－３－１〕　薬物の結合していない抗体のＬ鎖（$Ｌ_0$）及びＨ鎖（$Ｈ_0$）に対して、薬物の結合したＬ鎖（薬物が一つ結合したＬ鎖：$Ｌ_1$）及びＨ鎖（薬物が一つ結合したＨ鎖：$Ｈ_1$、薬物が二つ結合したＨ鎖：$Ｈ_2$、薬物が三つ結合したＨ鎖：$Ｈ_3$）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、$Ｌ_0$、$Ｌ_1$、$Ｈ_0$、$Ｈ_1$、$Ｈ_2$、$Ｈ_3$の順に溶出される。$Ｌ_0$及び$Ｈ_0$との保持時間比較により検出ピークを$Ｌ_0$、$Ｌ_1$、$Ｈ_0$、$Ｈ_1$、$Ｈ_2$、$Ｈ_3$のいずれかに割り当てることができる。

〔Ｆ－３－２〕　薬物リンカーにＵＶ吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、Ｌ鎖、Ｈ鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

[0113] [数1]

$$\text{Ｌ鎖ピーク面積補正値}\ (L_i) = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{Ｌ鎖のモル吸光係数}}{\text{Ｌ鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0114]

[数2]

$$\text{H鎖ピーク面積補正値}\ (H_i) = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{H鎖のモル吸光係数}}{\text{H鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0115] ここで、各抗体におけるＬ鎖及びＨ鎖のモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423）によって、各抗体のＬ鎖及びＨ鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。トラスツズマブの場合、そのアミノ酸配列に従って、Ｌ鎖のモル吸光係数として２６１５０を、Ｈ鎖のモル吸光係数として８１２９０を推定値として用いた。また、薬物リンカーのモル吸光係数（２８０ｎｍ）は、各薬物リンカーをメルカプトエタノール又はＮ－アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（２８０ｎｍ）を用いた。

〔Ｆ－３－３〕 ピーク面積補正値合計に対する各鎖ピーク面積比（％）を下式に従って計算する。

[0116] [数3]

$$\text{L鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{H鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li}, A_{Hi} : L_i, H_i各々のピーク面積補正値

[0117] 〔Ｆ－３－４〕 抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算する。

薬物平均結合数＝（L_0ピーク面積比×０＋L_0ピーク面積比×１＋H_0ピーク面積比×０＋H_1ピーク面積比×１＋H_2ピーク面積比×２＋H_3ピーク面積

比×３）／１００×２

[0118] 製造方法１において使用される製造中間体化合物について以下に述べる。

製造方法１における式（２）で示される化合物は次式：

(maleimid-N-yl)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-(NH-DX)

で示される化合物である。

式中、

n^3は、整数の２から８を示し、

L^2は、-NH-$(CH_2CH_2-O)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-又は単結合を示し、

ここで、n^4は、１から６の整数を示し、

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

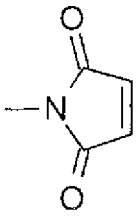
n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^aは、-O-又は単結合を示し、

(maleimid-N-yl)-は、次式

[0119] [化20]

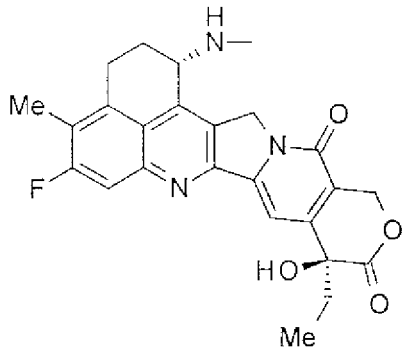


[0120] で示される、マレイミジル基（2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl基）で、窒素原子が結合部位となっている基であり、

-(NH-DX)は、次式

[0121]

[化21]



[0122] 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。

[0123] L^2は、単結合であるか、-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-である場合にはn^4が整数の２から４であることが製造中間体として好ましい。

L^Pのペプチド残基としては、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。この様なペプチド残基のうち、L^Pが４個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。より具体的には、L^Pが-GGFG-のテトラペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。

[0124] また、-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-としては、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましく、より好ましくは、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2である化合物である。

[0125] さらに、式（２）で示される化合物は、n^3が整数の２から５であり、L^2が単結合であり、-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-が、-NH-CH_2CH_2-、-NH-$CH_2CH_2CH_2$-、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-である化合物である。さらに、n^3が、整数の２又は５である化合物が好ましい。

[0126] また、式（２）で示される化合物は、n^3が整数の２から５であり、L^2が-NH-$(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$であって、$n^4$が整数の２から４であり、-NH-$(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$が、-NH-$CH_2CH_2-$、-NH-$CH_2CH_2CH_2-$、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2-$、-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、-NH-$CH_2-O-CH_2-$、又は-NH-$CH_2CH_2-O-CH_2-$である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、n^4が整数の２又は４の化合物である。さらに、-NH-$(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-$が、-NH-$CH_2CH_2CH_2-$、-NH-CH_2-O-CH_2-、又は-NH-$CH_2CH_2-O-CH_2-$である化合物が好ましい。

[0127] この様な本発明化合物の製造に有用な中間体として好ましいものとしては以下のものを例示することができる。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

、

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

$_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

FG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX)、

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

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

[0128] 上記の製造中間体化合物の群から選ばれる薬物－リンカー化合物を、抗ＨＥＲ２抗体又はその反応性誘導体と反応させることによって抗ＨＥＲ２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て本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートを製造することができる。この場合、抗ＨＥＲ２抗体の反応性誘導体を使用することが好ましく、特に抗ＨＥＲ２抗体を還元処理して得られる反応性誘導体が好ましい。

[0129] 以下のものが製造中間体としてより好ましい化合物である。

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

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

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

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

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

)、

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

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

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

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

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

[0130] また、上記の中間体化合物群の中では次式：

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

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

又は

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

で示される化合物がさらに好ましい化合物である。

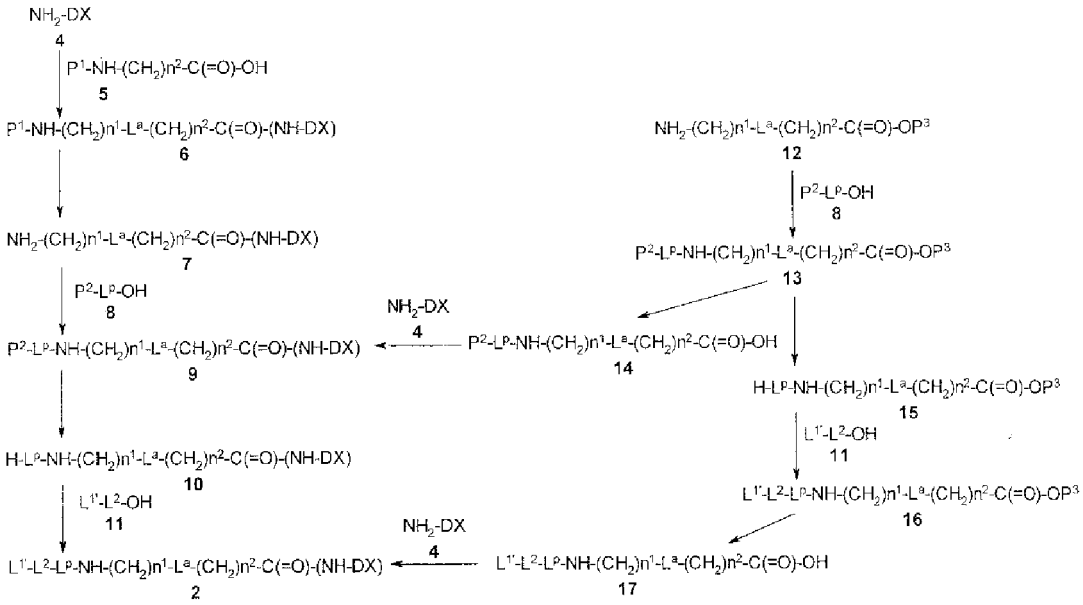
[0131] なお、コンジュゲートの量を確保するために、同様な条件で作製して得られた平均薬物数が同程度の複数のコンジュゲート（例えば±１程度）を混合して新たなロットにすることができる。その場合、平均薬物数は混合前の平均薬物数の間に収まる。

[0132] ２．製造方法２

先の製造方法で使用した中間体である式（２）で示される化合物及びそれらの薬理上許容される塩は、例えば下記の方法によって製造することができる。

[0133]

[化22]



[0134] [式中、L1’は末端マレイミジル基を示し、P1、P2、及びP3は保護基を示す。]

[0135] カルボン酸（５）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、NH_2-DX（４）又はその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（６）を製造することができる。NH_2-DX（４）は、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）を示す。

この反応は、ペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよい。活性エステルには各種のものがあるが、例えばｐ－ニトロフェノール等のフェノール類、Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾール或はＮ－ヒドロキシスクシンイミド等とカルボン酸（５）をＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド或は１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩等の縮合剤を用いて反応させれば製造できる。また、活性エステルは、カルボン酸（５）とペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート等との反応；カルボン酸（５）と１－ベンゾトリアゾリルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファイトとの反応；カルボン酸（５）と

シアノホスホン酸ジエチルとの反応（塩入法）；カルボン酸（５）とトリフェニルホスフィン及び２，２’－ジピリジルジスルフィドとの反応（向山法）；カルボン酸（５）と４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド（ＤＭＴＭＭ）の様なトリアジン誘導体との反応；等によっても製造することができる。また、カルボン酸（５）を塩基存在下に塩化チオニル、オキザリルクロリド等の酸ハロゲン化物で処理することによって製造できる酸ハライド法等によって反応を行うこともできる。

上記の様に得たカルボン酸（５）の活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物を化合物（４）と適当な塩基存在下に、不活性な溶媒中で－７８℃～１５０℃の反応温度で反応させることによって化合物（６）を製造することができる。なお、「不活性な溶媒」とはその溶媒が採用された反応において実施される目的とされた反応を阻害することのない溶媒を意味する。

[0136] 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、水素化カリウム等の、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の炭酸塩、アルコキシド、水酸化物、又は水素化物；ｎ－ブチルリチウム等のアルキルリチウム、又はリチウムジイソプロピルアミド等のジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウムビス（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基；さらにはピリジン、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）等の三級アミン或は含窒素複素環化合物等の有機塩基を挙げることができる。

[0137] 本反応に用いる不活性な溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素系溶媒；テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタン、ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチ

ルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリジン－２－オン等のアミド系溶媒；を挙げることができ、これらに加えて場合によってはジメチルスルホキシド、スルホラン等のスルホキシド系溶媒；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒；メタノール、エタノール等のアルコール系の溶媒等を使用することも可能である。さらにはこれ等を混合して使用することもできる。

[0138] 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；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選択すればよい。

得られた化合物（６）の末端アミノ基の保護基P^1を脱保護させることによって化合物（７）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

Ｎ末端をP^2で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（７）に反応させることによって、化合物（９）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（７）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、及び塩基、不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基P^2は、化合物（６）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられている様に、ペプチドカルボン酸（８）を構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応と脱保護を繰り返し、伸長させて化合物（９

）を製造することもできる。

得られた化合物（９）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることによって化合物（１０）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（１０）に反応させることによって、化合物（２）を製造することができる。カルボン酸（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、及び不活性溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0139] 化合物（９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

Ｎ末端をP^2で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、カルボキシ基をP^3で保護したアミン化合物（１２）と反応させることによって化合物（１３）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（１２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

化合物（１３）のアミノ基の保護基P^2としては、通常用いられる保護基であれば特に制限はない。

具体的には水酸基の保護基としては、メトキシメチル基等のアルコキシメチル基；ベンジル基、４－メトキシベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；アセチル基等のアルカノイル基；ベンゾイル基等のアロイル基；ｔｅｒｔ－ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；等を挙げることができる。カルボキシ基は、メチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基等のアルキル基、アリル基、又はベンジル基等のアリールメチル基とのエステル等として保護することができる。アミノ基は、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルキルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニル基、又は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トキシカルボニル基；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；等を挙げることができる。

カルボキシ基の保護基P^3としては、有機合成化学、中でもペプチド合成においてカルボキシ基の保護基として通常用いられている保護基を使用すればよく、具体的にはメチル基、エチル基、ｔｅｒｔ－ブチル等のアルキルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル等であり上記の保護基から適宜選択して使用すればよい。

この場合に、アミノ基の保護基とカルボキシ基の保護基が異なる方法又は条件で除去できることが好ましい。例えばP^2がｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル基であり、P^3がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基はアミノ基とカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、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（１３）のカルボキシ基の保護基P^3を脱保護させることによって化合物（１４）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（１４）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（９）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、及び塩基や不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0140] 化合物（２）は、例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（１３）のアミノ基の保護基P^2を脱保護させることによって化合物（１５）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬

や条件を選択すればよい。

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（１５）と反応させることによって化合物（１６）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１１）と化合物（１５）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１６）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（１７）を製造することができる。この脱保護は、化合物（１４）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

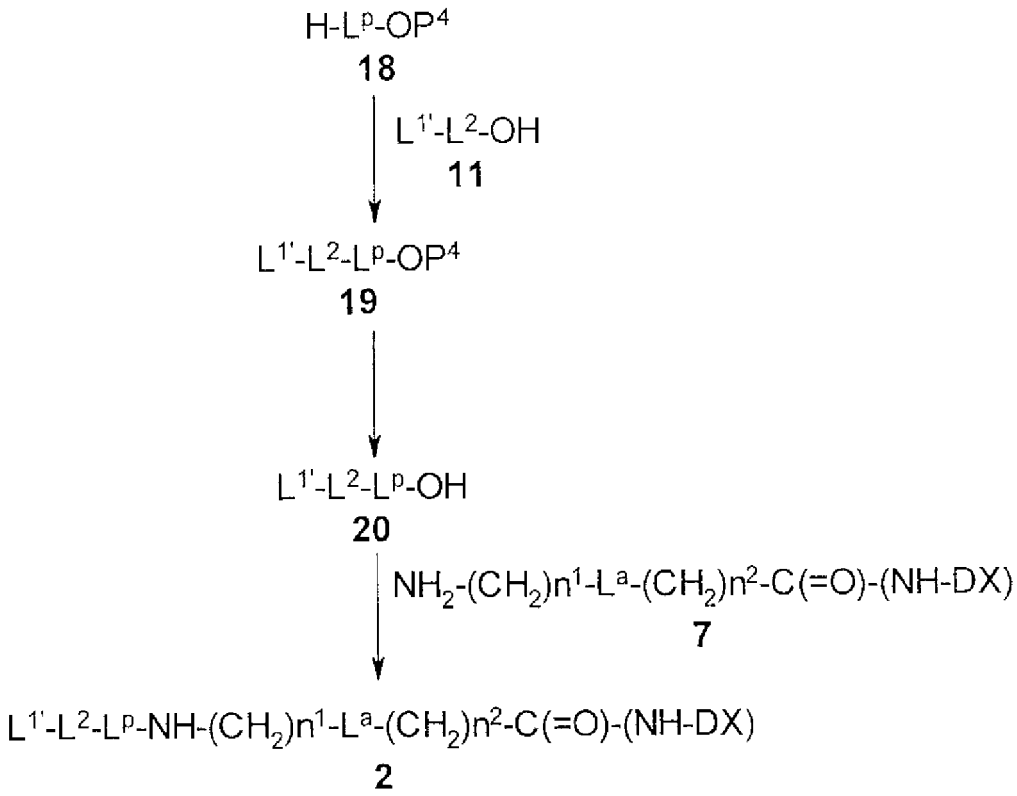
化合物（１７）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0141] ３．製造方法３

中間体の式（２）で示される化合物は下記の方法によっても製造することもできる。

[0142]

[化23]



[0143] [式中、L1'は末端がマレイミジル基に変換された構造のL1であり、P4は保護基を示す]

[0144] 化合物（１１）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、Ｃ末端をP4で保護したペプチドカルボン酸（１８）と反応させることによって化合物（１９）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１８）と化合物（１１）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。化合物（１８）のカルボキシ基の保護基P4は先に述べた保護基から適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１９）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（２０）を製造することができる。この脱保護は、化合物（１４）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

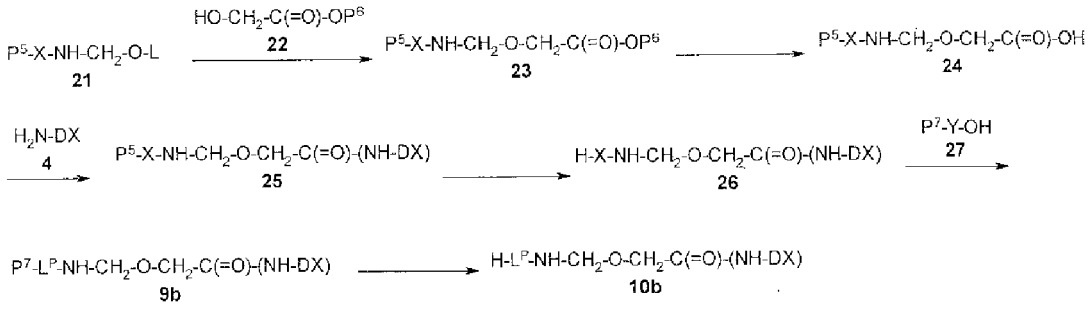
得られた化合物（２０）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、

化合物（７）に反応させることによって、化合物（２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0145] ４．製造方法４

以下に、製造方法２に記載の製造中間体（１０）のうち、n^1=1、L^a=0の化合物（１０ｂ）の製造方法について詳述する。式（１０ｂ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法で製造することができる。

[0146] [化24]



[0147] ［式中、L^Pは前記と同じものを示し、Lはアシル基であって、アセチル基等のアルカノイル基若しくはベンゾイル基等のアロイル基であるか、又は水素原子を示し、Ｘ及びＹは１から３個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを、P^5及びP^7はアミノ基の保護基を、P^6はカルボキシ基の保護基を示す］

[0148] 式（２１）で示される化合物は、特開２００２－６０３５１号公報に記載される手法や文献（J. Org. Chem., 51巻, 3196頁, 1986年）記載の方法、又はその方法を応用して必要に応じて保護基の除去や官能基変換を行うことによって製造することができる。この他、末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチドの酸アミドをアルデヒド又はケトンと処理することによって得ることができる。

化合物（２１）を、不活性な溶媒中、酸又は塩基存在下で冷却下から室温の温度条件で水酸基を有する化合物（２２）と反応させることによって、化

合物（２３）を製造することができる。

ここで使用できる酸としては例えば、フッ化水素酸、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ホウ酸等の無機酸；酢酸、クエン酸、パラトルエンスルホン酸、メタンスルホン酸等の有機酸；テトラフルオロボレート、塩化亜鉛、塩化スズ、塩化アルミニウム、塩化鉄等のルイス酸；等を挙げることができる。これらのうちではスルホン酸類、特にパラトルエンスルホン酸が好ましい。さらに塩基としては、既に述べられた塩基の中から適宜選択して使用すればよく、特にカリウム　ｔｅｒｔ－ブトキシド等のアルカリ金属アルコキシド；水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物；水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属又はアルカリ土類金属水素化物；リチウム　ジイソプロピルアミド等のジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウム　ビス（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基；等が好ましい。

反応に用いる溶媒としては、テトラヒドロフラン、１，４－ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；等が用いられる。上記の溶媒は水との混合物としてもよい。

また、P^5に例示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はない。代表的なものとして製造方法２で記載したアミノ基の保護基を挙げることができるが、本反応中においてP^5に例示されるアミノ基の保護基が切断される場合がある。その場合には、必要に応じて適当なアミノ基の保護試薬と適宜反応させて再度保護基を導入すればよい。

化合物（２４）は、化合物（２３）の保護基P^6を除去することによって製造することができる。ここで、P^6として例示されるカルボキシ基の保護基としては、製造方法２に代表的なものが記載されており、ここから適宜選択することができる。化合物（２３）において、アミノ基の保護基P^5とカルボキシ基の保護基P^6が異なる方法又は条件で除去できる保護基であることが望ましい。例えば、P^5が９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P^6

がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基は、アミノ基及びカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよく、それらの保護基の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（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）又はその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（２５）を製造し、得られた化合物（２５）の保護基P^5を除去することによって化合物（２６）を製造することができる。化合物（４）とカルボン酸（２４）との反応及び保護基P^6を除去する反応では、製造方法２で述べた試薬や反応条件と同様のものを用いればよい。

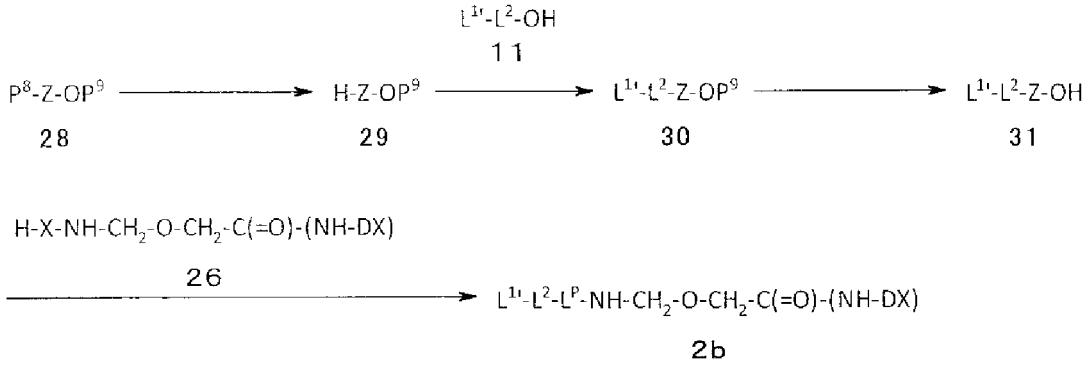
化合物（２６）と末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチド（２７）を反応させることによって化合物（９ｂ）を製造し、得られた化合物（９ｂ）の保護基P^7を除去することによって化合物（１０ｂ）を製造することができる。P^7として示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法２で記載したアミノ基の保護基を挙げることができ、その除去に際しても保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（２６）と化合物（２７）との反応では、ペプチド合成に通常使用される反応試薬や条件を準用すればよい。上記の方法で製造した化合物（１０ｂ）は、上述の製造方法に従って本発明化合物（１）に導くことができる。

[0149] ５．製造方法５

以下に、製造方法２に記載の製造中間体（２）のうち、n^1=1、n^2=1、L^a=0の化合物（２）の製造方法について詳述する。式（２）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法で製造することができる。

[0150]

[化25]



[0151] [式中、$L^{1'}$、L^2、L^Pは前記と同じものを示し、Zは１から３個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを、P^8はアミノ基の保護基を、P^9はカルボキシ基の保護基を示す。]

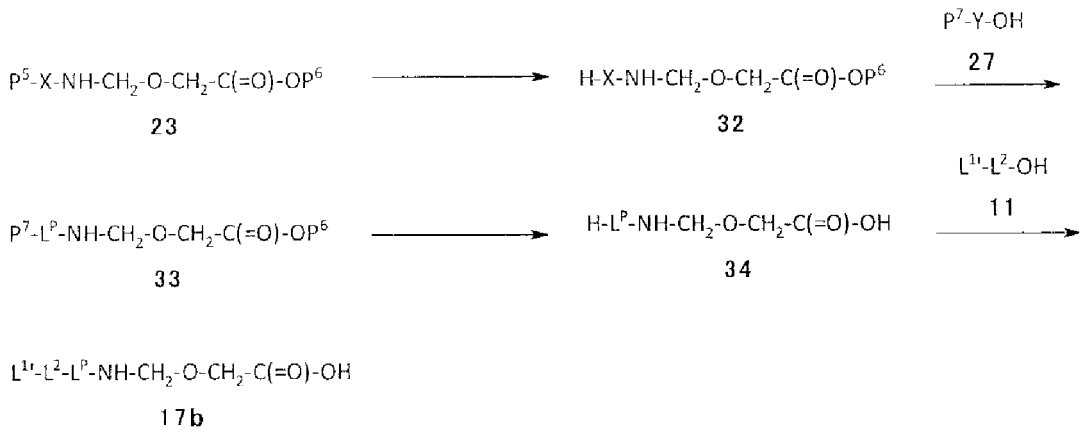
[0152] 末端アミノ基及びカルボキシ基が保護されたアミノ酸又はオリゴペプチド（２８）の保護基P^8を除去することによって化合物（２９）が得られる。得られたアミン体（２９）と化合物（１１）を反応させることによって化合物（３０）を製造できる。P^8として示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法２で記載したアミノ基の保護基を挙げることができる。また、保護基P^8の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（２９）とカルボン酸（１１）との反応では、製造方法２で述べた試薬や反応条件と同様のものを用いればよい。

化合物（３０）の保護基P^9を除去することによって化合物（３１）を製造し、得られたカルボン酸（３１）と化合物（２６）を反応させることによって製造中間体（２ｂ）を製造できる。P^8として示されるカルボキシ基の保護基としては、代表的なものを製造方法２に記載した他、その脱保護反応では製造方法２で述べた試薬や反応条件と同様のものを用いればよい。また、化合物（２６）とカルボン酸（３１）との反応では、ペプチド合成に通常使用される反応試薬や条件を準用すればよい。上記の方法で製造した化合物（２ｂ）は、上述の製造方法に従って本発明化合物（１）に導くことができる。

[0153] ６．製造方法６

以下に、製造方法２に記載の製造中間体（１７）のうち、n^1=1、n^2=1、L^a=0の化合物（１７ｂ）の製造方法について詳述する。式（１７ｂ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法によっても製造することができる。

[0154] [化26]



[0155] ［式中、$L^{1'}$、L^2、L^P、X、Y、P^5、P^6、及びP^7は前記と同じものを示す。］

[0156] 末端アミノ基及び末端カルボキシ基が保護された化合物（２３）のアミノ基の保護基P^5を脱保護することによって化合物（３２）を製造し、得られたアミン体（３２）と末端アミノ基又はアミノ基が保護されたオリゴペプチド（２７）を反応させることによって化合物（３３）を製造できる。P^5として示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法２で記載したアミノ基の保護基を挙げることができる。また、保護基P^5の除去に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。ここで、P^6として示されるカルボキシ基の保護基及びP^7として示されるアミノ基の保護基としては、代表的なものとして製造方法２で記載したカルボキシ基及びアミノ基の保護基を挙げることができる。化合物（３３）では、カルボキシ基の保護基P^6とアミノ基の保護基P^7は同じ方法又は条件で除去できる保護基であることが望ましい。例えばP^6がベンジルエステル基であり、P^7がベンジルオキシカルボニル基である組み合わせを代表的なものとして挙げることができる。

化合物（３４）は、化合物（３３）のカルボキシ基の保護基P^6とアミノ基の保護基P^7を除去することによって製造することができる。カルボキシ基の保護基P^6とアミノ基の保護基P^7のそれぞれを逐次除去することによっても化合物（３７）を製造することができる他、P^6とP^7が同じ方法又は条件で除去できる保護基であれば、両者を一工程で除去して化合物（３４）を簡便に製造することができる。

得られた化合物（３４）と化合物（１１）を反応させることによって化合物（１７ｂ）を製造できる。化合物（３４）と化合物（１１）との反応では、製造方法２で述べた試薬や反応条件と同様なものを用いればよい。

[0157] 本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートは、大気中に放置したり、又は再結晶や精製操作をすることにより、水分を吸収し、或は吸着水が付着する等して、水和物になる場合があり、その様な水を含む化合物又は塩も本発明に包含される。

また、本発明には、種々の放射性又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、原子同位体を非天然割合で含有し得る。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）、又は炭素－14（^{14}C）等を挙げることができる。また、本発明化合物は、例えば、トリチウム（^{3}H）、ヨウ素－125（^{125}I）、又は炭素－14（^{14}C）等の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、治療又は予防剤、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。

[0158] ［医薬］

本発明の抗ＨＥＲ２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。

すなわち、本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートは、癌治療の主

要な治療法である化学療法のための薬剤として選択して使用することができ、その結果として、癌細胞の成長を遅らせ、増殖を抑え、さらには癌細胞を破壊することができる。これ等によって、癌患者において、癌による症状からの解放や、ＱＯＬの改善を達成でき、癌患者の生命を保って治療効果が達成される。癌細胞の破壊には至らない場合であっても、癌細胞の増殖の抑制やコントロールによって癌患者においてより高いＱＯＬを達成しつつより長期の生存を達成させることができる。

このような薬物療法においての薬物単独での使用の他、アジュバント療法において他の療法と組み合わせる薬剤としても使用でき、外科手術や、放射線療法、ホルモン療法等と組み合わせることができる。さらにはネオアジュバント療法における薬物療法の薬剤として使用することもできる。

以上のような治療的使用の他、微細な転移癌細胞の増殖を押さえ、さらには破壊する効果も期待することができる。特に原発性の癌細胞においてＨＥＲ２の発現が確認されたときに本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートを投与することよって癌転移の抑制や、予防効果を期待することができる。例えば、転移過程で体液中にある癌細胞を抑制し破壊する効果や、いずれかの組織に着床した直後の微細な癌細胞に対する抑制、破壊等の効果が期待できる。したがって、特に外科的な癌の除去後においての癌転移の抑制、予防効果が期待できる。

本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートは、患者に対しては全身療法として投与する他、癌組織に局所的に投与して治療効果を期待することができる。

[0159] 本発明の抗ＨＥＲ２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、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌、乳癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、又は陰茎癌等を挙げることができる。本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートは、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ＨＥＲ２蛋白を発現している癌細胞が治療対象となる。本明細書において、「ＨＥＲ２蛋白を発現している癌」とは、その細胞表面にＨＥＲ２蛋白を有する細胞を含む癌である。ＨＥＲ２蛋白はさまざまなヒトの腫瘍において過剰発現しており、ＨＥＲ２蛋白の過剰発現を評価する免疫組織化学染色法（ＩＨＣ）やＨＥＲ２遺伝子の増幅を評価する蛍光in situハイブリダイゼーション法（ＦＩＳＨ）等、この分野で通常実施される方法を用いて評価することができる。

また、本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートは、その抗ＨＥＲ２抗体が癌細胞表面で発現しているＨＥＲ２蛋白を認識し、さらに内在化することによって抗腫瘍効果が発現されることから、本発明の抗ＨＥＲ２抗体－薬物コンジュゲートの治療対象は「ＨＥＲ２蛋白を発現している癌」に限定されることはなく、例えば白血病、悪性リンパ腫、形質細胞種、骨髄腫、又は肉腫も治療対象とすることができる。

[0160] 本発明の抗ＨＥＲ２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。

[0161] 本発明の抗ＨＥＲ２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。

[0162] 本発明の抗ＨＥＲ２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）を含む。ここで液体には、例えば、水及び油（石油、動物起源、植物起源、又は合成起源の油）が含まれる。油は、例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等であってよい。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、並びにデキストロース水溶液及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、この分野で公知のものか

ら適宜選択することができる。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤若しくは乳化剤、又は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。

[0163] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗ＨＥＲ２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、及び皮下の経路を挙げることができるが、これらに限定されることはない。投与は、例えば、注入又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。

[0164] 代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤及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又はサシェ等に密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末又は無水の濃縮物として、別個に、又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形態の場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水又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、注射用滅菌水又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。

[0165] 本発明の医薬組成物は、本願の抗ＨＥＲ２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ＨＥＲ２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ＨＥＲ２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

様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、或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。この様な癌治療剤として、５－ＦＵ、ｐｅｒｔｕｚｕｍａｂ、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ｃｉｓｐｌａｔｉｎ、ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ、ｃａｐｅｃｉｔａｂｉｎｅ、ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ（ＣＰＴ－１１）、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｄｏｃｅｔａｘｅｌ、ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ、ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ、ｖｉｎｏｒｅｌｂｉｎｅ、ｅｖｅｒｏｌｉｍｓ、ｔａｎｅｓｐｉｍｙｃｉｎ、ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ、ｏｘａｌｉｐｌａｔｉｎ、ｌａｐａｔｉｎｉｂ、ａｄｏ-ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ ｅｍｔａｎｓｉｎｅ（Ｔ－ＤＭ１）又は国際公開第２００３／０３８０４３号に記載の薬剤、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。

[0166] この様な医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤或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。

[0167] 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ＨＥＲ２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回或は１～１８０日間に１回の間隔で複数回投与すればよい。

実施例

[0168] 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。

[0169] 参考例１　トラスツズマブの調製

Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）４４０ｍｇ／バイアルの１４本分を陽イオン交換クロマトグラフィーバッファーＡ（２５ｍＭ Ｃｉｔｒａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ，３０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ５．０）の２Ｌに溶解し、０．２μｍフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏ．：Ｓｔｅｒｉｃｕｐ ０．２２μｍ，ＧＶＰＶＤＦ Ｍｅｍｂｒａｎｅ）にてろ過を行った。陽イオン交換クロマトグラフィーカラム（ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＨＰ ２４０ｍｌ，ＸＫ５０カラム）に試料を供し、陽イオン交換クロマトグラフィーバッファーＢ（２５ｍＭ Ｃｉｔｒａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ，５００ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ５．０）にてＮａＣｌ濃度３０ｍＭ～５００ｍＭの直線勾配（リニアグラディエント）により溶出させ、ＩｇＧモノマーを分画した。サイズ排除クロマトグラフィー分析により、モノマー高純度９８％以上のサンプルを合わせ、ＵＦ３０Ｋ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏ．：ＰＥＬＬＩＣＯＮ ＸＬ Ｆｉｌｔｅｒ，ＢＩＯＭＡＸ ３０Ｋ，ＰＸＢ０３０Ａ５０）による濃縮及びＣＢＳバッファー（１０ｍＭ Ｃｉｔｒａｔｅ／１４０ｍＭ ＮａＣｌ，ｐＨ６．０）に置換した。ＣＢＳバッファーに置換したサンプルは０．２μｍフィルター（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ：Ｍｉｎｉｓａｒｔ－Ｐｌｕｓ０．２μｍ，１７８２３Ｋ）にてろ過を行った。

[0170] 参考例２　トラスツズマブエムタンシンの製造　Ｔ－ＤＭ１

抗体のＳＭＣＣ化：参考例１にて作成したトラスツズマブを製造方法１に

記載した共通操作Ｃ－２（緩衝液としてＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡを使用）、共通操作Ａ及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、ＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡにバッファー交換し、トラスツズマブ（１６０．０ｍｇ）がＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡ（７．６０ｍＬ）に溶解する溶液を１５ｍＬポリプロピレン製チューブに用意した。次いでＳＭＣＣ（１．８４ｍｇ）のＤＭＳＯ溶液（０．４０ｍＬ；抗体一分子に対して約５．１当量相当）を室温で添加し、反応溶液の抗体濃度を２０ｍｇ／ｍＬに調整してチューブ・ローテーター（ＭＴＲ－１０３、アズワン株式会社）を用いて室温で２時間反応させた。この反応液を共通操作Ｄ－２（緩衝液としてＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡを使用）に従った精製を行い、ＳＭＣＣ誘導化された抗体を１５４．９ｍｇ含む溶液を１２ｍＬ得た。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：５０ｍＬポリプロピレン製チューブに入れた上記溶液へＰＢＳ６．５／ＥＤＴＡ（２．５６ｍＬ）及びＮ^{2}－デアセチル－Ｎ^{2}－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－メイタンシン（４．６７ｍｇ；ＤＭ１、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２００６年、４９巻、１４号、４３９２項）のＤＭＡ（ジメチルアセトアミド）溶液（０．９３ｍＬ；ＳＭＣＣ誘導化された抗体一分子に対して約５．８当量相当）を室温で添加し、反応溶液の抗体濃度を１０ｍｇ／ｍＬに調整してチューブ・ローテーターを用いて室温で１６．５時間反応させた。

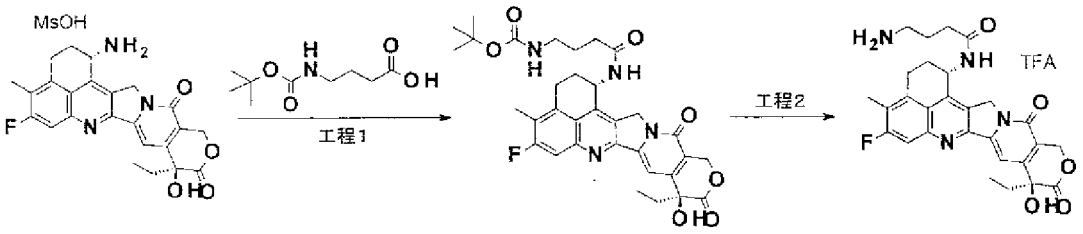
精製操作：上記溶液を、塩化ナトリウム（１３７ｍＭ）を含むリン酸ナトリウム緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ６．５）を用いた共通操作Ｄ－１による精製を行い、目的の参考例化合物を含有する溶液を３５ｍＬ得た。

特性評価：２５２ｎｍ及び２８０ｎｍの二波長におけるＵＶ吸光度を用いた共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：４．１４ｍｇ／ｍＬ、抗体収量：１４４．９ｍｇ（９１％）、抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０。

[0171] 実施例１　中間体（１）

[化27]



[0172] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）カーバメート

４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸（０．２３７ｇ，１．１３ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１３０ｇ，１．１３ｍｍｏＬ）、及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．２１６ｇ，１．１３ｍｍｏＬ）を加えて１時間攪拌した。その反応溶液をエキサテカンのメタンスルホン酸塩（０．５００ｇ，０．９４ｍｍｏＬ）、及びトリエチルアミン（０．１５７ｍＬ，１．１３ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１０ｍＬ）に滴下し、室温で１日攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．５９５ｇ，定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３１（９Ｈ，ｓ），１．５８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．６６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．８２－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２１（３Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．９２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｓ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），

５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５９－５．５５（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．７８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６２１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0173] 工程２：４－アミノ－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］ブタンアミド

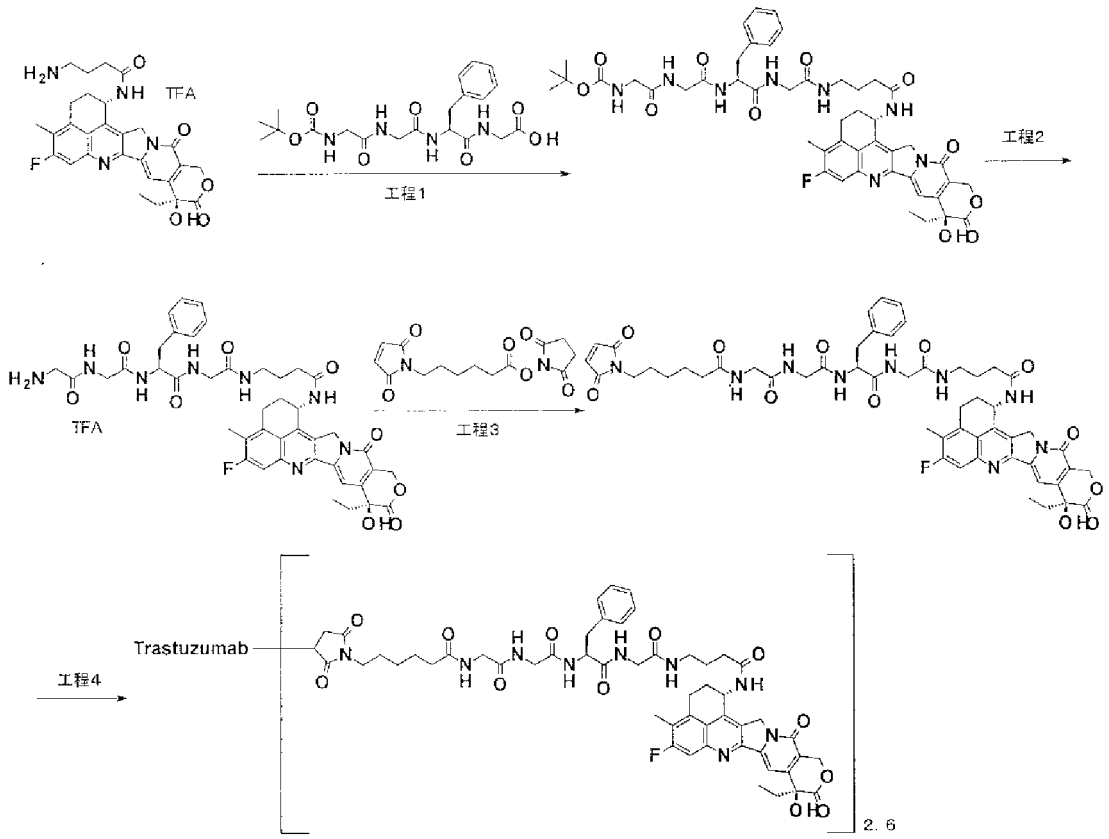
上記工程１で得た化合物（０．３８８ｇ，０．６１ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（９ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（９ｍＬ）を加えて４時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（０．３４３ｇ，定量的）を得た。

^{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）$^{+}$

[0174] 実施例２　抗体－薬物コンジュゲート（２）

[化28]



[0175] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシン（０．０８１ｇ，０．１９ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（３ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．０２１ｇ，０．１９ｍｍｏＬ）、及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．０３６ｇ，０．１９ｍｍｏＬ）を加え、３．５時間撹拌した。この反応溶液を実施例１工程２で得た化合物（０．０８０ｇ，０．１５ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１．５ｍＬ

）に滴下し、室温で４時間攪拌した。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）$^+$

[0176] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（１．９７ｇ，２．１０ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（７ｍＬ）に溶解し、トリフルオロ酢酸（７ｍＬ）を加えて１時間攪拌

した。溶媒を減圧留去し、残留物にトルエンを加えて共沸させ、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（１．９７ｇ，９９％）を得た。

^{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）$^+$

[0177] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（３３７ｍｇ，０．３５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．２ｍＬ）溶液に、トリエチルアミン（４４．３ｍＬ，０．３１８ｍｍｏＬ）、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミ

ジル（１１９．７ｍｇ，０．３８８ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝５：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（２７８．０ｍｇ，７６％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．１２－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．６６－１．７６（２Ｈ，ｍ），１．８０－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．２１（６Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．０，９．８Ｈｚ），２．９８－３．２１（５Ｈ，ｍ），３．５５－３．７７（８Ｈ，ｍ），４．４１－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．１Ｈｚ），５．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．１Ｈｚ），５．５４－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．２０－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０３２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0178] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（２）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、製造方法１に記載した共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（３．０ｍＬ）を１５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（ＴＣＥＰ，東京化成工業株式会社）水溶液（０．０９３４ｍＬ；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（Ｎａｃａ

ｌａｉ　Ｔｅｓｑｕｅ，Ｉｎｃ．；０．１５０ｍＬ）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：上記溶液を２２℃で１０分間インキュベートした後に上記工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．１８７ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃で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、Ｎ－アセチルシステイン（ＮＡＣ，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ）水溶液（０．０３７４ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃で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。

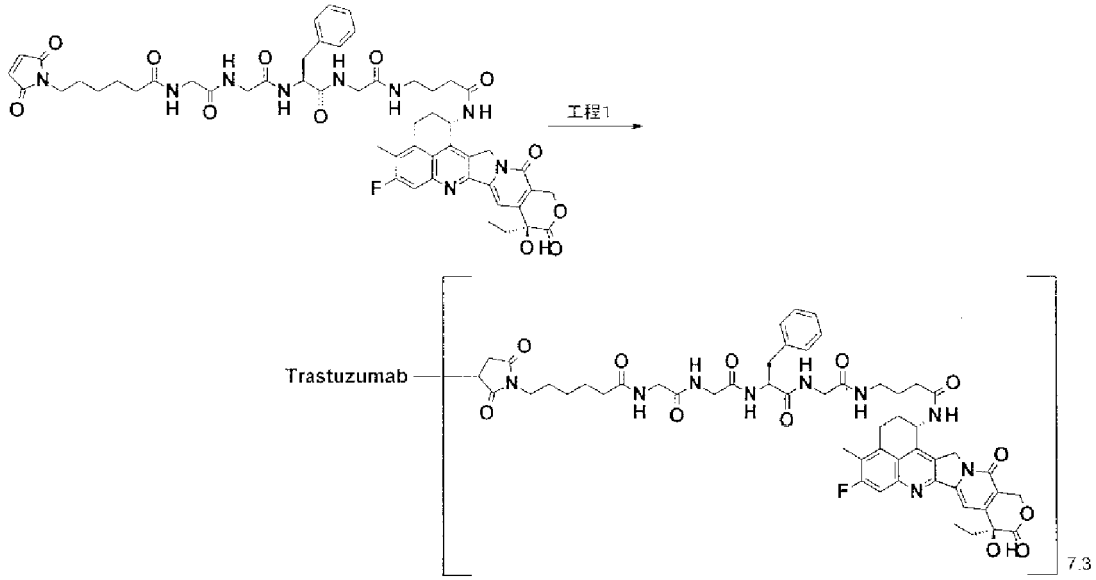
精製：上記溶液を、製造方法１に記載した共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ６．０を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た後、共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した。

特性評価：製造方法１に記載した共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：３．２１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２２．５ｍｇ（７５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．６。

[0179] 実施例３　抗体－薬物コンジュゲート（３）

[化29]



[0180] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８７ｍＬｍｇ$^{-1}$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水溶液（０．０３９ｍＬ；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（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。

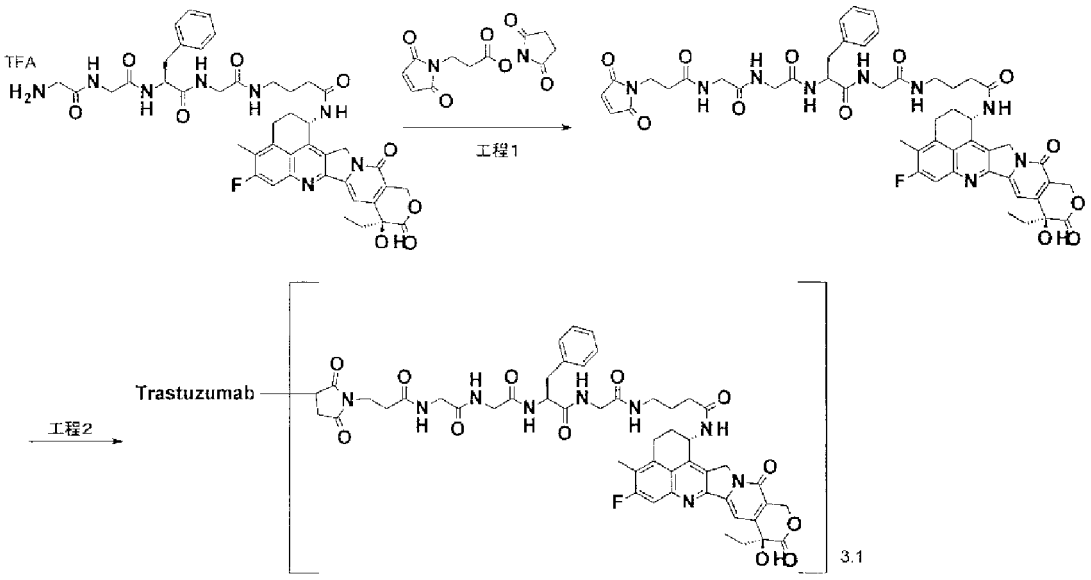
抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ＤＭＳＯ（０．０７２ｍＬ）と実施例２工程３の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０７８ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を室温で加え、チューブ・ローテーターを用いて室温で４０分攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０１５５ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を６ｍＬ得た。さらに共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した後、共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：９．８５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：６．９ｍｇ（５５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．３。

[0181] 実施例４　抗体－薬物コンジュゲート（４）

[化30]



[0182] 工程１：Ｎ－［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例１の化合物（８０ｍｇ，０．０８４ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－マレイミドプロピオン酸Ｎ－スクシンイミジル（２４．６ｍｇ，０．０９２４ｍｍｏＬ）を用いて、実

施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（６０．０ｍｇ，７３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７０－１．７８（２Ｈ，ｍ），１．８１－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．１２－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．８１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０１－３．１５（３Ｈ，ｍ），３．１６－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．３０－３．３５（１Ｈ，ｍ），３．５８－３．７１（６Ｈ，ｍ），３．７１－３．７９（１Ｈ，ｍ），４．４４－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．０Ｈｚ），５．２７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．０Ｈｚ），５．４３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．６Ｈｚ），５．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．６Ｈｚ），５．５７－５．６３（１Ｈ，ｍ），６．５６（１Ｈ，ｓ），７．０２（２Ｈ，ｓ），７．１７－７．２２（１Ｈ，ｍ），７．２２－７．３０（５Ｈ，ｍ），７．３４（１Ｈ，ｓ），７．７３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ），７．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．７Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ），８．１５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．３０（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１８．７，５．７Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９９０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0183] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（４）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（１ｍＬ）を１．５ｍＬポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．０１５５ｍＬ；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（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。

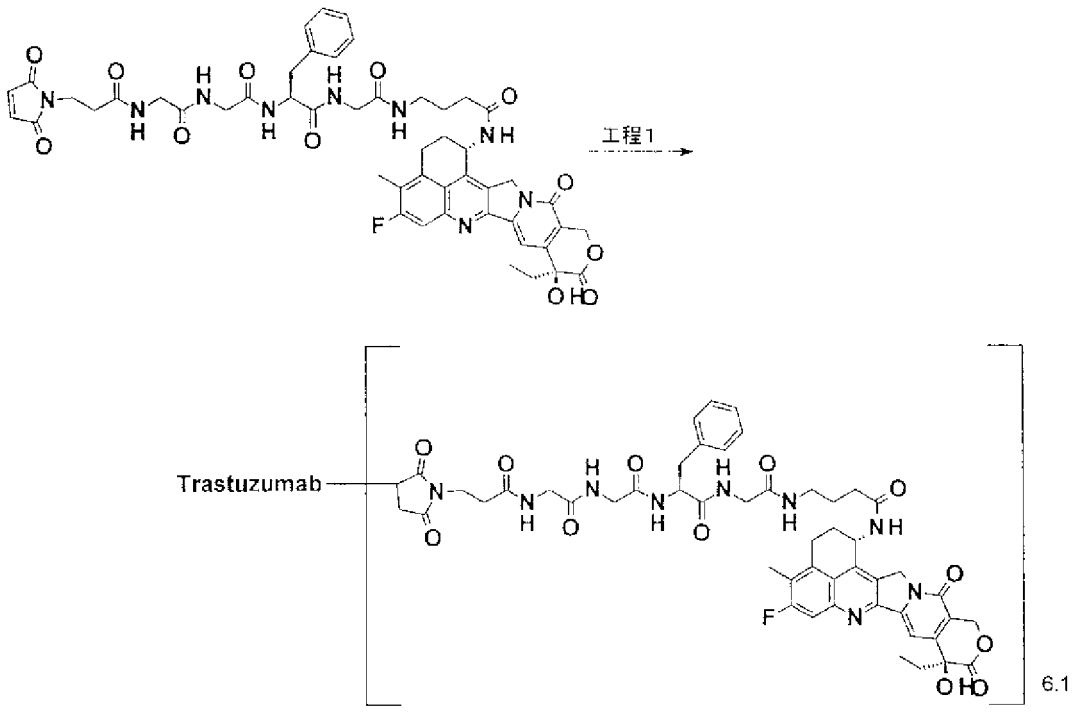
抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ＤＭＳＯ（０．０７２ｍＬ）と実施例２工程３の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０３１ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を室温で加え、チューブ・ローテーターを用いて室温で４０分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．００７８ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を６ｍＬ得た。共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．３２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．９ｍｇ（７９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．１。

[0184] 実施例５　抗体－薬物コンジュゲート（５）

[化31]



[0185] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５）

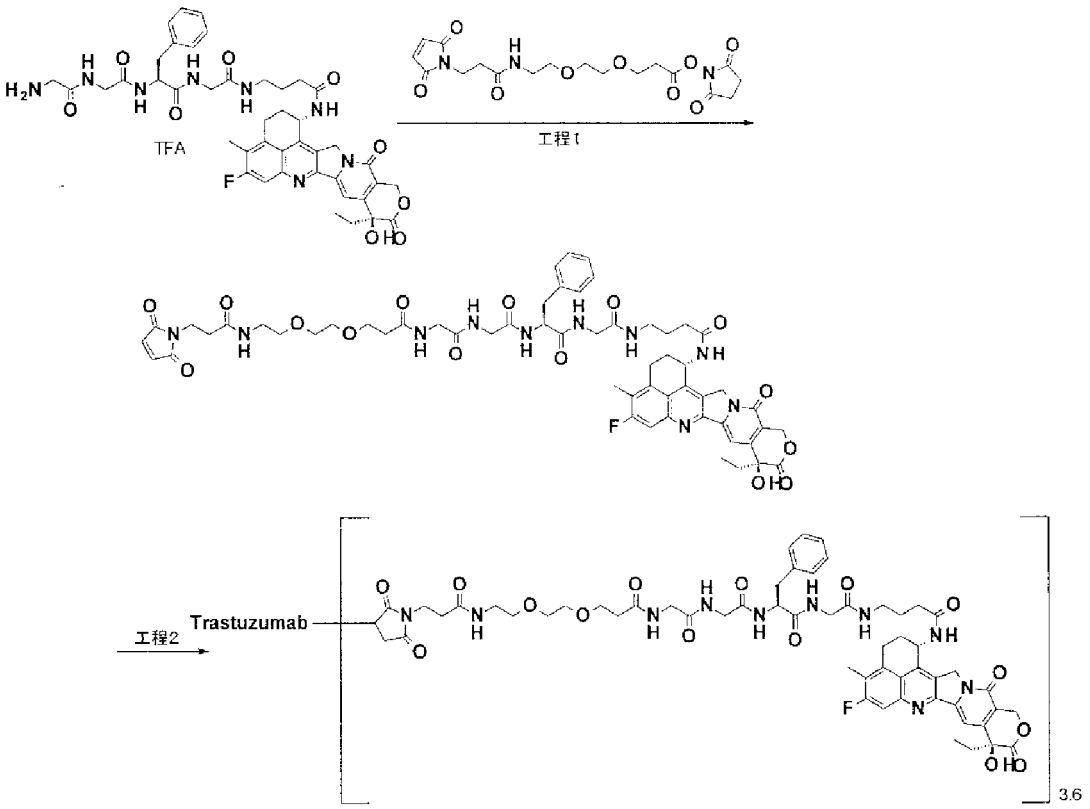
抗体還元時の抗体に対するＴＣＥＰのモル比が４．６となるよう１０ｍＭ

ＴＣＥＰ水溶液の添加量を調節し、薬物リンカー結合時の抗体に対する実施例４工程１の化合物のモル比が９．２となるよう１０ｍＭ薬物リンカー溶液の添加量を調節し、また、反応停止時の抗体に対するＮＡＣのモル比が１８．４となるよう１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液の添加量を調節し、実施例４工程２と同様の操作により、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．２３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．４ｍｇ（７４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．１。

[0186] 実施例６　抗体－薬物コンジュゲート（６）

[化32]



[0187] 工程１：Ｎ－｛３－［２－（２－｛［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］アミノ｝エトキシ）エトキシ］プロパノイル｝グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４

－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２工程２で得た化合物（１００ｍｇ，０．１１９ｍｍｏＬ）を、トリエチルアミンの代わりにジイソプロピルエチルアミン（２０．８μＬ，０．１１９ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－（２－（２－（３－マレインイミドプロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパン酸Ｎ－スクシンイミジル（５０．７ｍｇ，０．１１９ｍｍｏＬ）を用いて、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（６６．５ｍｇ，４８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８５（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．６５－１．７４（２Ｈ，ｍ），１．７７－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．１９（４Ｈ，ｍ），２．３０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．３３－２．３６（２Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），２．９６－３．１８（９Ｈ，ｍ），３．４２－３．４４（４Ｈ，ｍ），３．５３－３．７６（１０Ｈ，ｍ），４．４３（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝８．６，４．７Ｈｚ），５．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．５２－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），６．９８（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．１７（１Ｈ，ｍ），７．１８－７．２５（４Ｈ，ｍ），７．２９（１Ｈ，ｓ），７．６９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．３Ｈｚ），７．９８－８．０３（２Ｈ，ｍ），８．１１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１１４９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0188] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（６）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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水溶液（０．０１９ｍＬ；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（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、ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏ．ＬＬＣ；０．１０９ｍＬ）と上記工程１の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０３９ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を室温で加え、チューブ・ローテーターを用いて室温で４０分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．００８ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

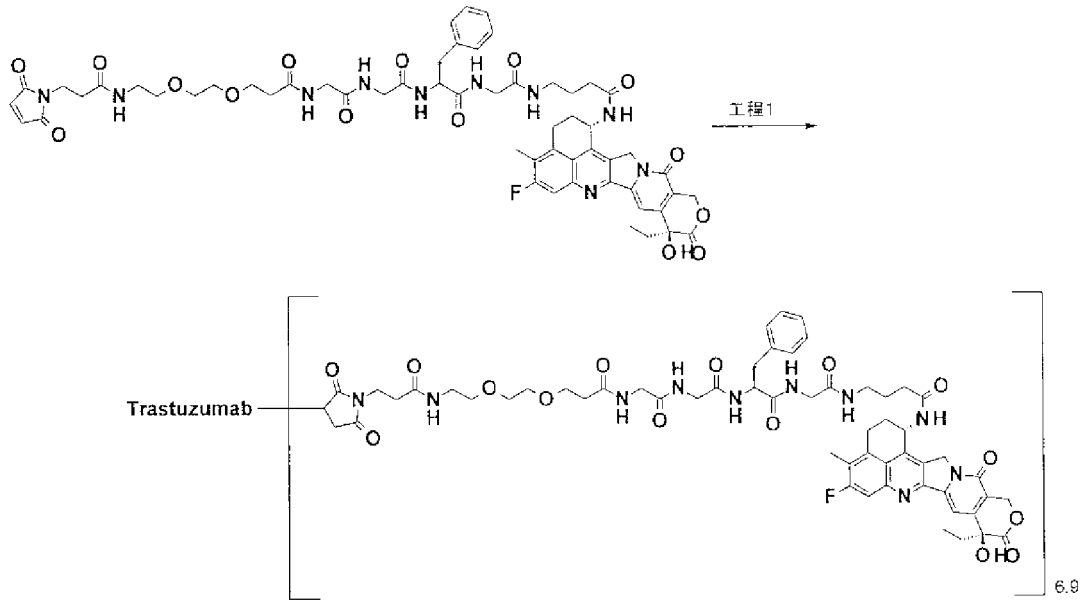
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．７６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．６ｍｇ（８５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．６。

[0189] 実施例７　抗体－薬物コンジュゲート（７）

[化33]



[0190] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（７）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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水溶液（０．０３９ｍＬ；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（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、ＤＭＳＯ（０．０７２ｍＬ）と実施例６工程１の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０７８ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を室温で加え、チューブ・ローテーターを用いて室温で４０分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０１５５ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

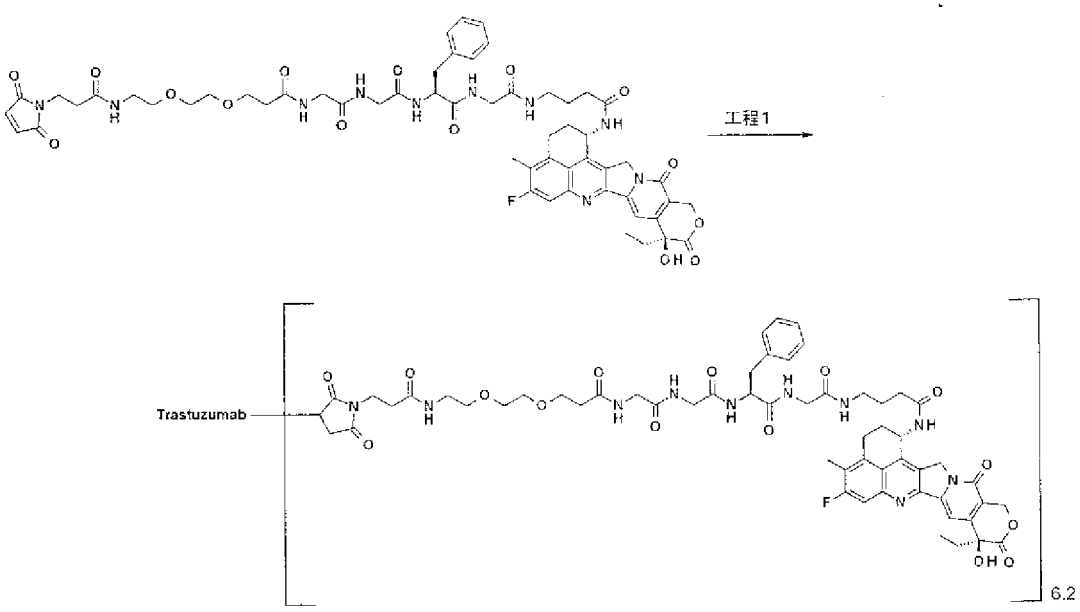
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．９３ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．６ｍｇ（９３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．９。

[0191] 実施例８　抗体－薬物コンジュゲート（８）

[化34]



[0192] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（８）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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水溶液（０．０３９ｍＬ；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（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、ＤＭＳＯ（０．０７２ｍＬ）と実施例６工程１の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０７８ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を室温で加え、チューブ・ローテーターを用いて室温で４０分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０１５５ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

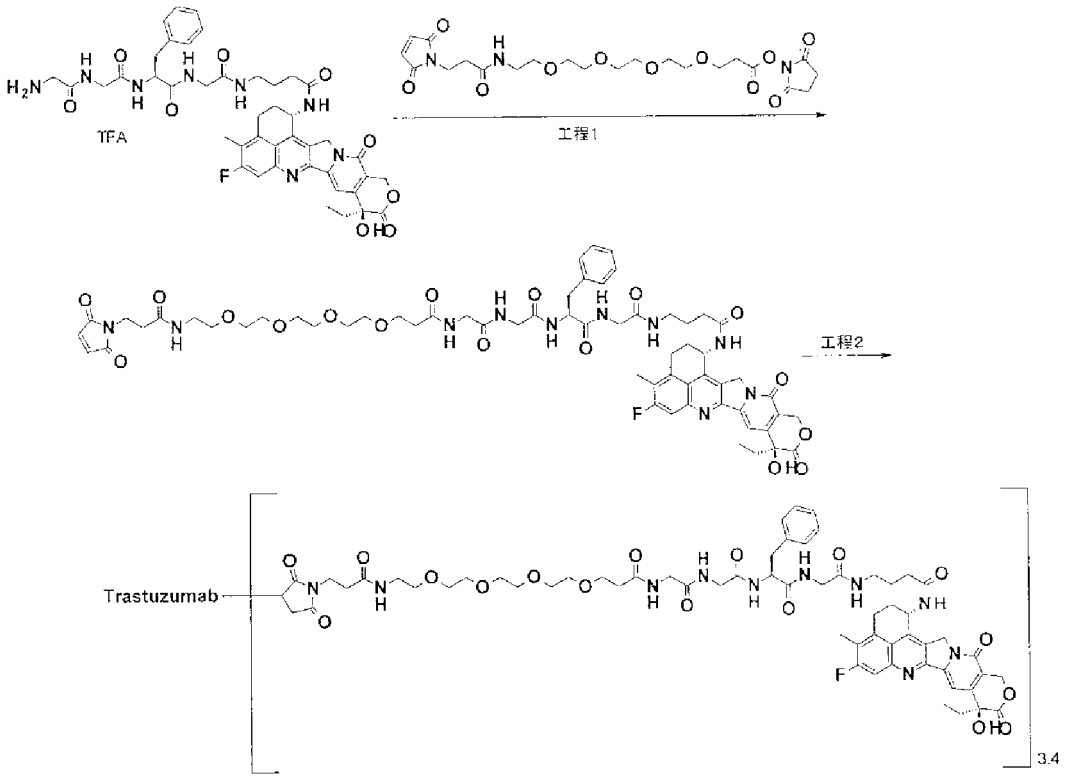
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を５．７ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．５０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．５５ｍｇ（８６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２。

[0193] 実施例９　抗体－薬物コンジュゲート（９）

[化35]



[0194] 工程１：Ｎ－［１９－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１７－オキソ－４，７，１０，１３－テトラオキソ－１

６－アザノナデカン－１－オイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（４－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－４－オキソブチル）グリシンアミド

実施例２工程２で得た化合物（９０ｍｇ，０．１０７ｍｍｏＬ）を、トリエチルアミンの代わりにジイソプロピルエチルアミン（１８．７μＬ，０．１０７ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに１－マレインイミド－３－オキソ－７，１０，１３，１６－テトラオキサ－４－アザノナデカン－１９－酸Ｎ－スクシンイミジル（５５．１ｍｇ，０．１０７ｍｍｏＬ）を用いて、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（５０ｍｇ，３７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８５（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．６４－１．７４（２Ｈ，ｍ），１．７７－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．１９（４Ｈ，ｍ），２．２７－２．３２（２Ｈ，ｍ），２．３３－２．３７（２Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），２．７２－２．８０（３Ｈ，ｍ），２．９６－３．１９（６Ｈ，ｍ），３．３９－３．４８（１０Ｈ，ｍ），３．５２－３．７５（１０Ｈ，ｍ），４．３９－４．４８（１Ｈ，ｍ），５．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．３８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．０Ｈｚ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．０Ｈｚ），５．５２－５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），６．９８（１Ｈ，ｓ），７．１３－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．２９（１Ｈ，ｓ），７．６９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９８－８．０３（２Ｈ，ｍ），８．１０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１２３７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

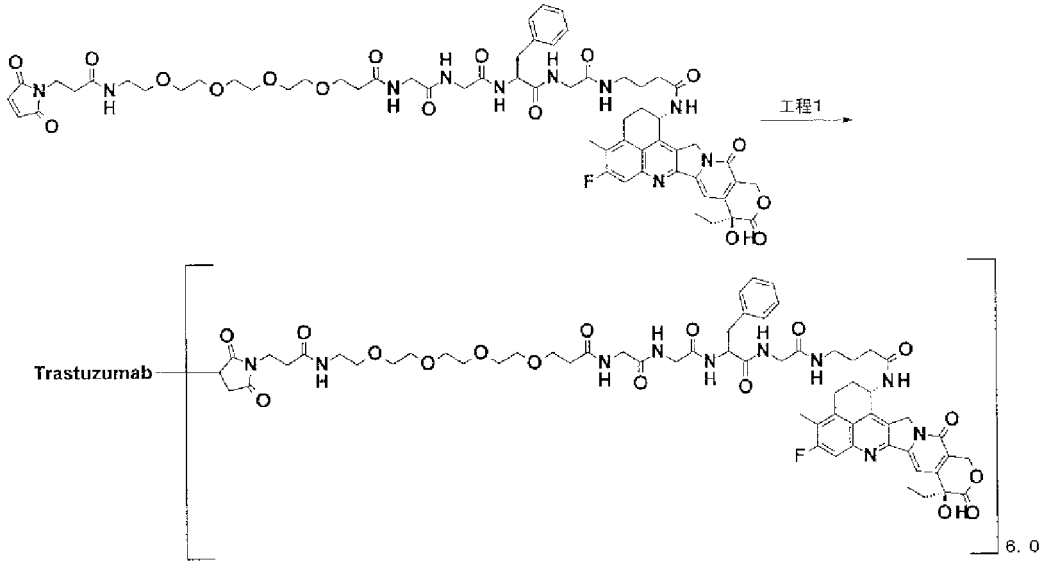
[0195] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（９）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例６工程２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：１．７５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．５ｍｇ（８４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４。

[0196] 実施例１０　抗体－薬物コンジュゲート（１０）

[化36]



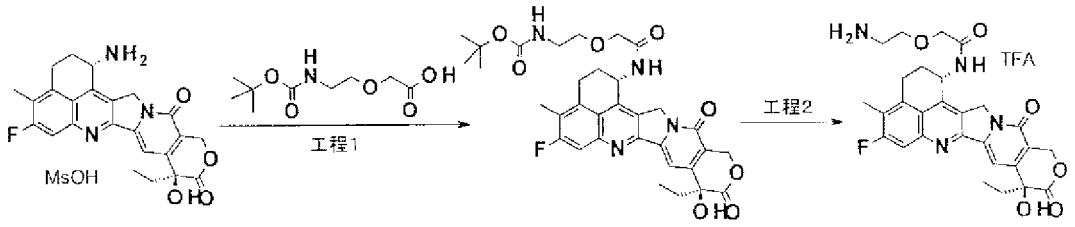
[0197] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１０）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例９工程１で得た化合物を用いて、実施例７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：１０．７ｍｇ（８６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．０。

[0198] 実施例１１　中間体（１１）

[化37]



[0199] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）エチル］カーバメート

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（３．１０ｇ，５．４７ｍｏＬ）を、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりに｛２－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］エトキシ｝酢酸（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９９２年，３５巻，２９２８頁；１．５５ｇ，６．０１ｍｍｏｌ）を用いて、実施例１工程１と同様に反応させ、標記化合物（２．５６ｇ，７３％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．２６（９Ｈ，ｓ），１．８１－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．１３－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），３．０８－３．２６（４Ｈ，ｍ），３．４３－３．５３（２Ｈ，ｍ），４．００（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１５．１Ｈｚ），４．０５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１５．１Ｈｚ），５．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．６Ｈｚ），５．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．６Ｈｚ），５．５９－５．６６（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．８６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６３７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0200] 工程２：２－（２－アミノエトキシ）－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アセトアミド

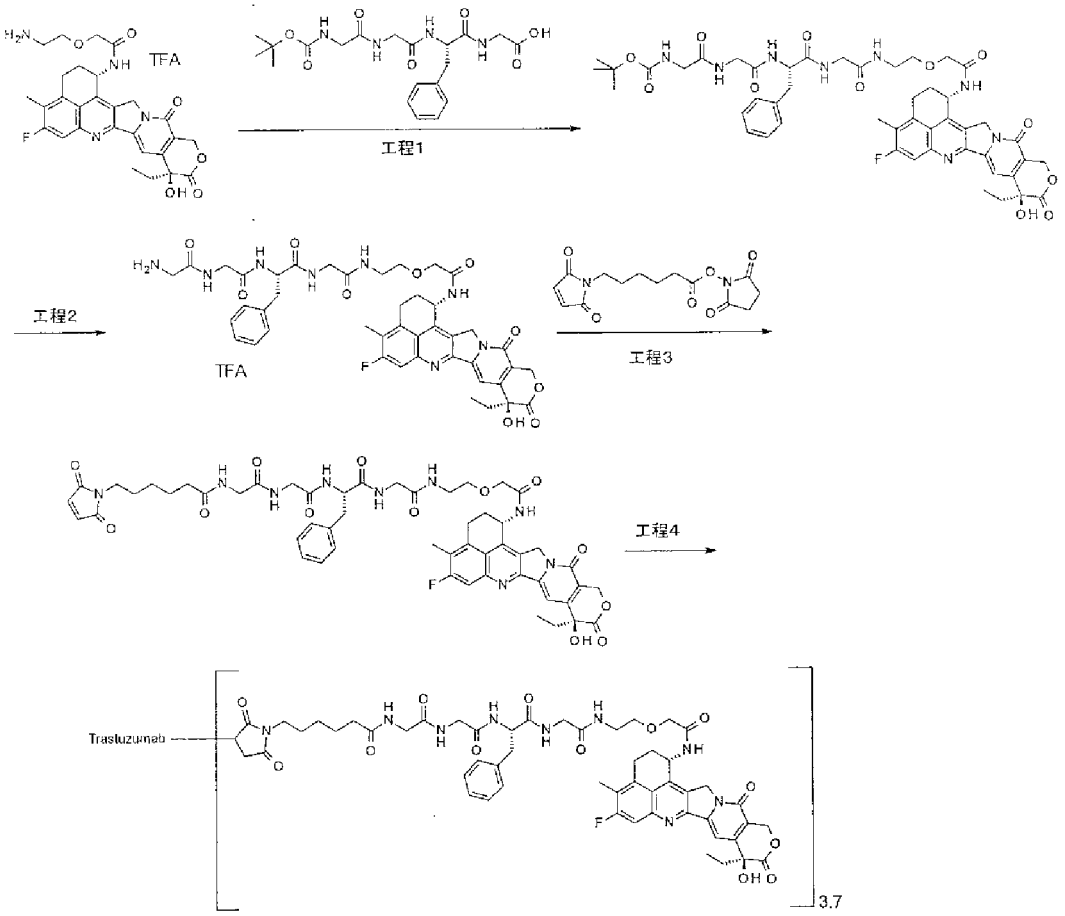
上記工程１で得た化合物（１．５０ｇ，２．３６ｍｏｌ）を、実施例１工程２と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（１．５０ｇ，定量的）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ），１．８１－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．１５－２．２３（２Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），３．０５（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），３．１５－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．７１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），４．１０（２Ｈ，ｓ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５８－５．６６（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．７３－７．８４（４Ｈ，ｍ），８．５５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：５３７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0201] 実施例１２　抗体－薬物コンジュゲート（１２）

[化38]



[0202] 工程１：Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）エチル］グリシンアミド

実施例１１工程２の化合物（５５４ｍｇ，０．８５ｍｍｏｌ）を、実施例２工程１と同様に反応させ、標記化合物（７７５ｍｇ，９５％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８５（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．３６（９Ｈ，ｓ），１．７８－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．１３－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．４，９．８Ｈｚ），２．９５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３

．４，４．３Ｈｚ），３．０９－３．２３（１Ｈ，ｍ），３．２３－３．３２（２Ｈ，ｍ），３．４０－３．６２（８Ｈ，ｍ），３．７３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．５，５．５Ｈｚ），４．０３（２Ｈ，ｓ），４．３９－４．４７（１Ｈ，ｍ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．８Ｈｚ），５．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．８Ｈｚ），５．５７－５．６４（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ），７．１３－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７６－７．８２（２Ｈ，ｍ），７．９０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．２Ｈｚ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９５５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0203] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）エチル］グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（６３０ｍｇ，０．６５９ｍｍｏｌ）を、実施例２工程２と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（５８８ｍｇ，９２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７９－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．１３－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．４，１０．１Ｈｚ），２．９９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．４，４．３Ｈｚ），３．０９－３．２３（１Ｈ，ｍ），３．２４－３．３２（３Ｈ，ｍ），３．４１－３．７１（７Ｈ，ｍ），３．８６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．８，５．８Ｈｚ），４．０４（２Ｈ，ｓ），４．５２（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝９．０，４

．１Ｈｚ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．５Ｈｚ），５．５６－５．６５（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１３－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８７－８．０１（４Ｈ，ｍ），８．２９－８．３６（２Ｈ，ｍ），８．４６－８．５５（２Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：８５５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0204] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）エチル］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（２４０ｍｇ，０．２４７ｍｍｏｌ）を、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（１６２ｍｇ，６２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），１．１３－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．７８－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．１４－２．２１（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．６，９．７Ｈｚ），２．９６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．６，４．５Ｈｚ），３．０８－３．２４（１Ｈ，ｍ），３．２４－３．３０（１Ｈ，ｍ），３．３３－３．４０（４Ｈ，ｍ），３．４７－３．６８（７Ｈ，ｍ），３．７２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．６，５．７Ｈｚ），４．０３（２Ｈ，ｓ），４．４２（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝８．６，４．２Ｈｚ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．７Ｈｚ），５．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．４４

（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．５７－５．６４（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２５（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８１（２Ｈ，ｍ），７．９９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０３－８．１１（２Ｈ，ｍ），８．２２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ）．ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０４８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

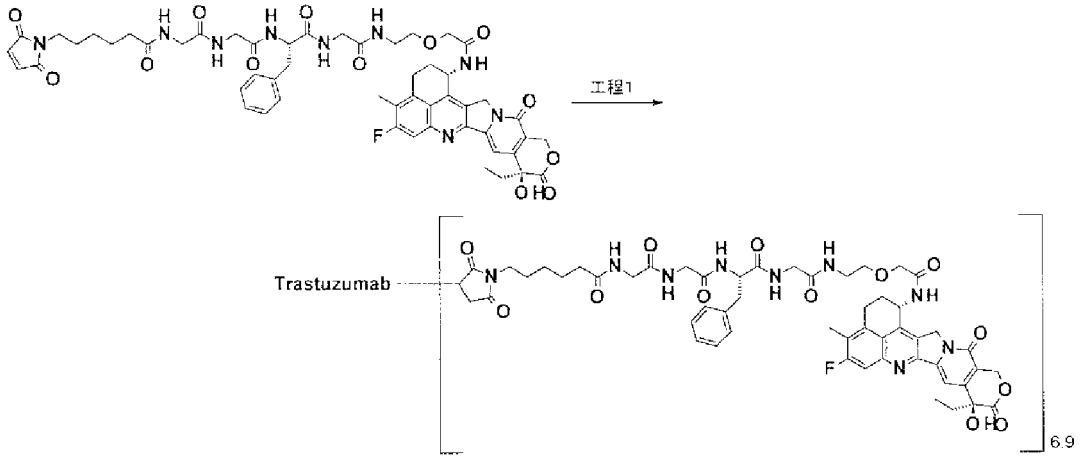
[0205] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（１２）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程３で得た化合物を用いて、実施例６工程２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。さらに共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した後、共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．７７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．５ｍｇ（６０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．７。

[0206] 実施例１３　抗体－薬物コンジュゲート（１３）

[化39]



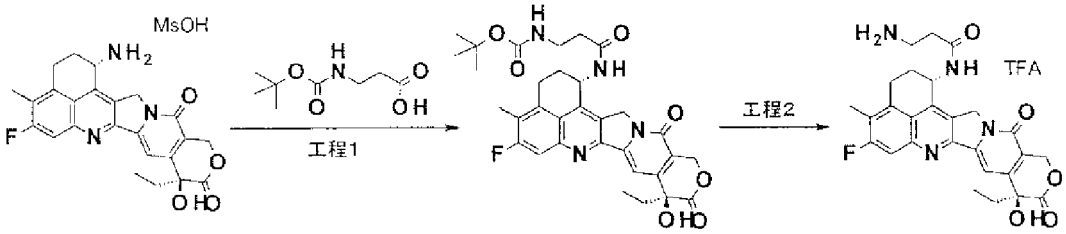
[0207] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１３）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例１２工程３で得た化合物を用いて、実施例７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。さらに共通操作Ａを使用して、溶液を濃縮した後、共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．６９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：７．５ｍｇ（６０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．９。

[0208] 実施例１４　中間体（１４）

[化40]



[0209] 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

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（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＝８．６

Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：６０７（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0210] 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

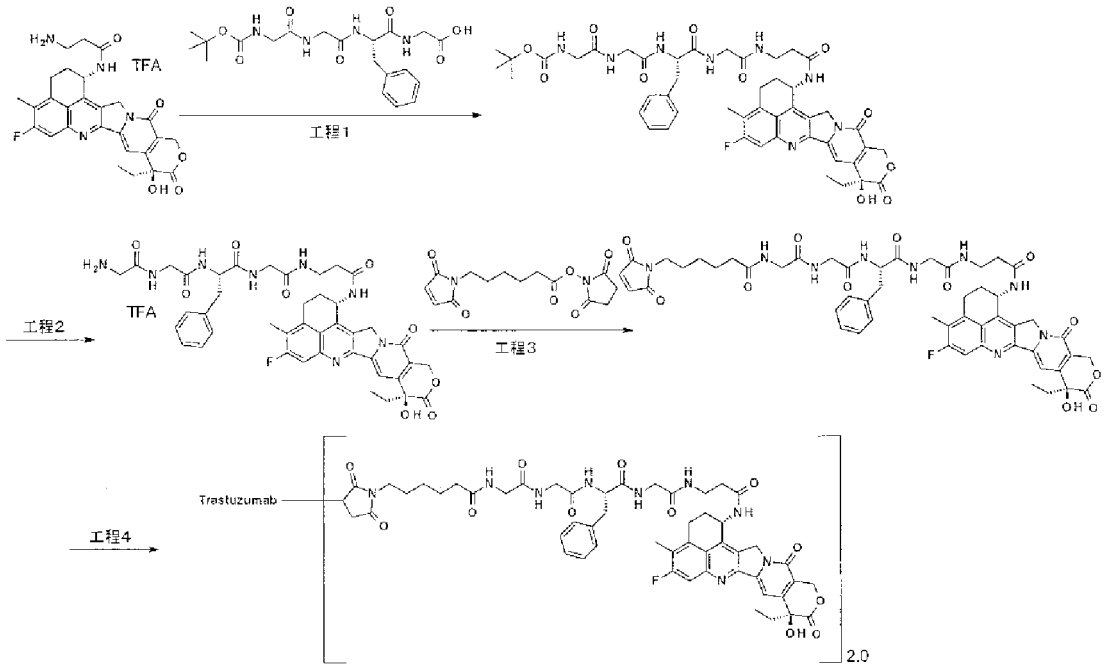
上記工程１で得た化合物を、実施例１工程２と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（４９９ｍｇ，８６％）を黄色固体として得た。

^{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）$^{+}$

[0211] 実施例１５　抗体－薬物コンジュゲート（１５）

[化41]



[0212] 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１４工程２で得た化合物（４８４ｍｇ，０．７８０ｍｍｏＬ）を、実施例２工程１と同様に反応させ、標記化合物（６２６ｍｇ，８７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．２７－１．４２（９Ｈ，ｍ），１．７７－１．９３（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｄ，Ｊ＝１．６Ｈｚ），２．４４－２．５４（２Ｈ，ｍ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．５，１０．２Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１２－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．５２（６Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），４．４２－４．５

４（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）．

[0213] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程１で得た化合物（６２４ｍｇ，０．６７５ｍｍｏＬ）を、実施例２工程２と同様に反応させ、標記化合物（６２６ｍｇ，９２％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８６（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．５，７．２Ｈｚ），２．０７－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．４４－２．５４（２Ｈ，ｍ），２．７５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．３Ｈｚ），３．１２－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．５８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝４．７Ｈｚ），３．６９（３Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１１．２，５．７Ｈｚ），３．８７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１７．０，５．７Ｈｚ），４．５４（１Ｈ，ｍ，Ｊ＝１７．８，４．５Ｈｚ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５１－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１４－７．２９（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．

９Ｈｚ），７．８８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），７．９７（３Ｈ，ｂｒｓ），８．２９－８．３８（２Ｈ，ｍ），８．５０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．５５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：８２５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0214] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

上記工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６４６ｍｍｏＬ）を、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（１４．０ｍｇ，２１％）を固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．１２－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．３９－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．７９－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０２－２．２０（２Ｈ，ｍ），２．０７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），２．３０－２．４２（４Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，９．４Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．７，４．９Ｈｚ），３．１２－３．２１（２Ｈ，ｍ），３．２６－３．４２（２Ｈ，ｍ），３．５０－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．４０－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．６Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５１－５．６２（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８４（２Ｈ，ｍ），８．０１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．３Ｈｚ），８．０６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．５３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０１８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0215] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（１５）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）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水溶液（０．０１５５ｍＬ；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（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３で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０３１１ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を加え、２２℃で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水溶液（０．００６２２ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、さらに２２℃で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。

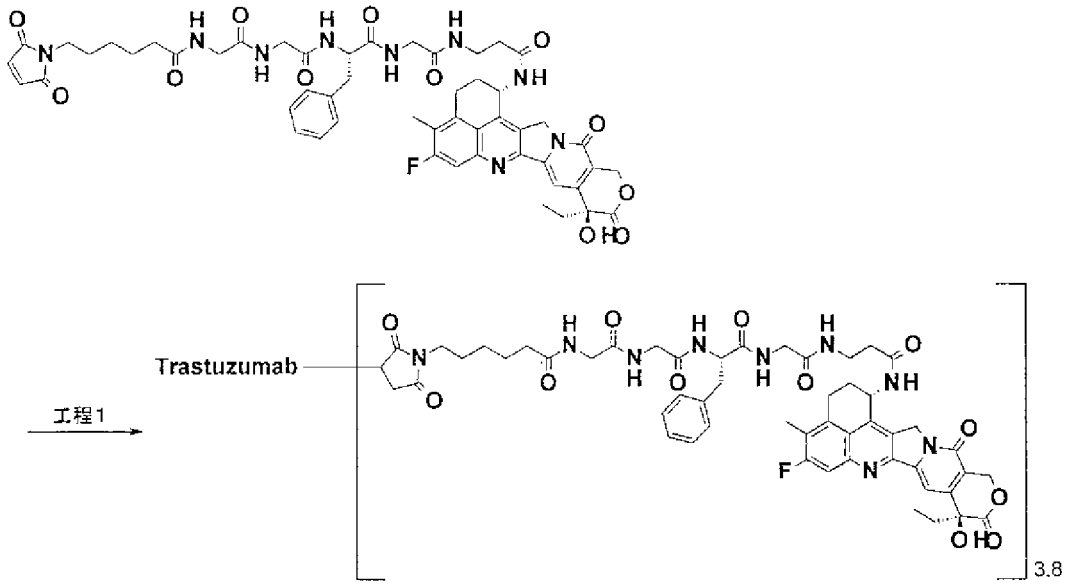
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ６．０を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ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）：２．０。

[0216] 実施例１６　抗体－薬物コンジュゲート（１６）

[化42]



[0217] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１６）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）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水溶液（０．０３１１ｍＬ；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（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１５工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０６２２ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃で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水溶液（０．０１２４ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃で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、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ６．０を使用）

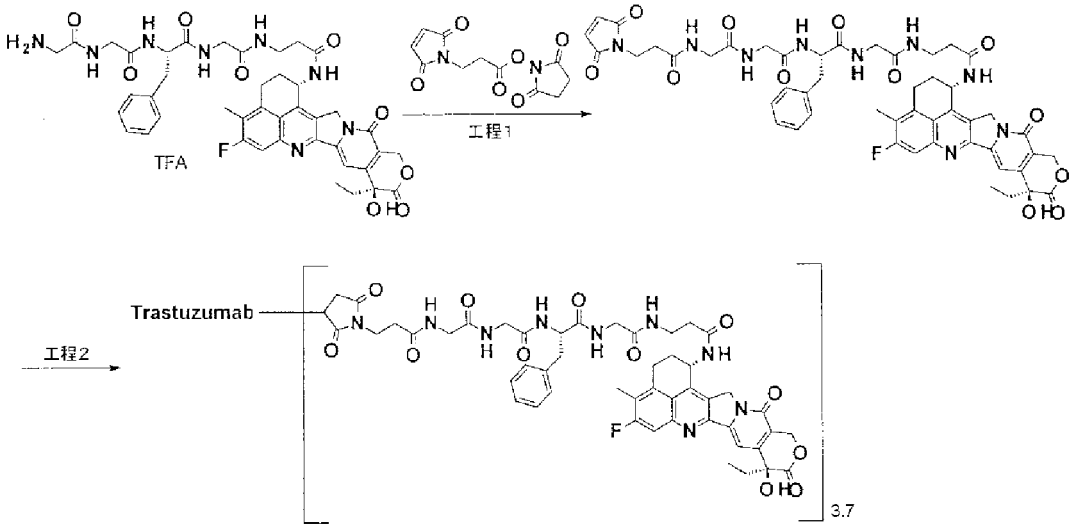
を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ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）：３．８。

[0218] 実施例１７　抗体－薬物コンジュゲート（１７）

[化43]



[0219] 工程１：Ｎ－［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

実施例１５工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－マレイミドプロピオン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（３６．０ｍｇ，５７％）を淡黄色固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８５（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１４．４，７．５Ｈｚ），２

．０５－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．３０－２．４４（５Ｈ，ｍ），２．７３－２．８４（１Ｈ，ｍ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．１７（３Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），３．２６－３．４０（２Ｈ，ｍ），３．４１－３．８１（６Ｈ，ｍ），４．４０－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５２－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．２Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．２０－８．３１（２Ｈ，ｍ），８．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：９７６（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

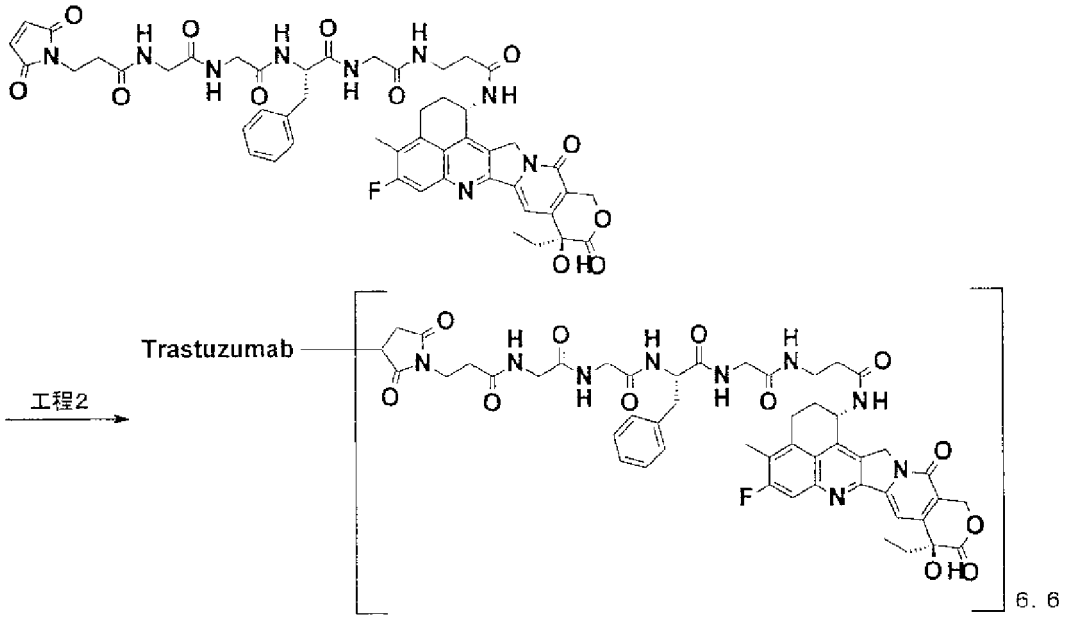
[0220] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（１７）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例６工程２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：１．７４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．４ｍｇ（８３％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．７。

[0221] 実施例１８　抗体－薬物コンジュゲート（１８）

[化44]



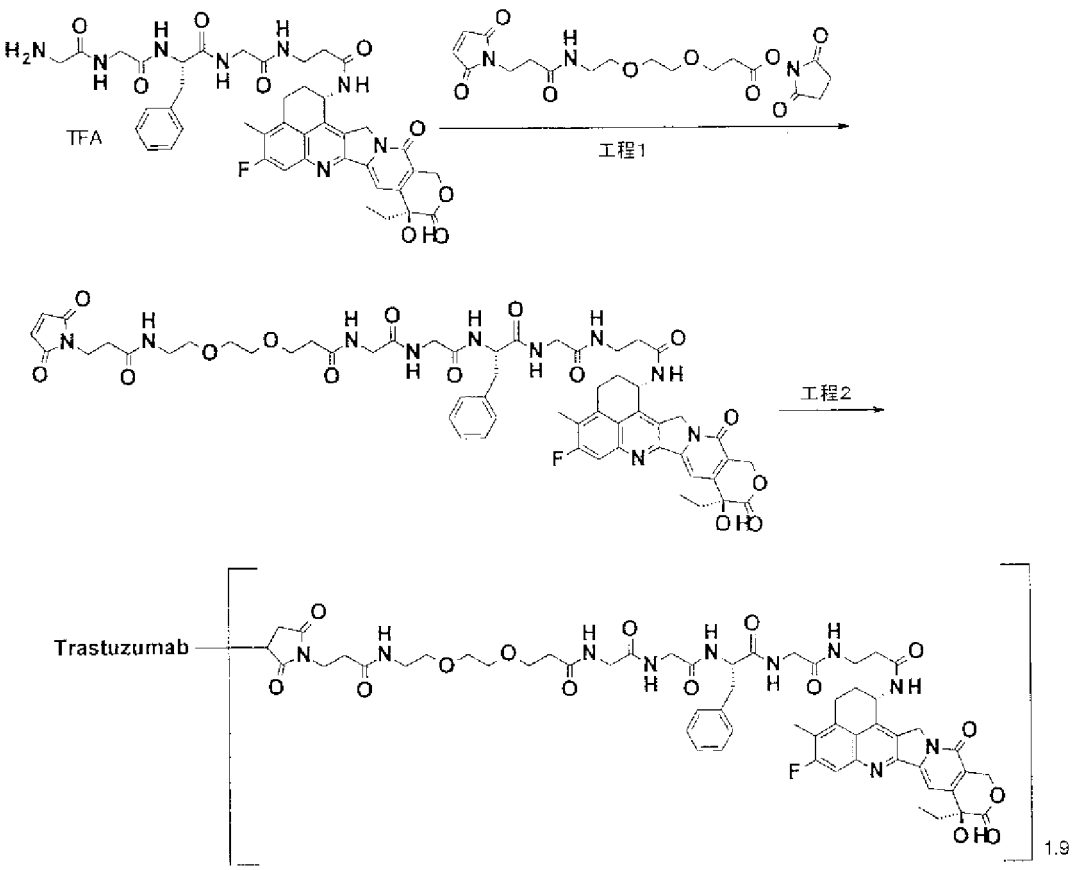
[0222] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（１８）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例１７工程１で得た化合物を用いて、実施例７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：１．９８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．９ｍｇ（９５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．６。

[0223] 実施例１９　抗体－薬物コンジュゲート（１９）

[化45]



[0224] 工程１：Ｎ－｛３－［２－（２－｛［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノイル］アミノ｝）エトキシ］プロパノイル｝グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（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１５工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに３－（２－（２－（３－マレインイミドプロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（２３．０ｍｇ，３１％）を固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ

＝７．４Ｈｚ），１．７７－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０７－２．２１（２Ｈ，ｍ），２．２７－２．４２（６Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７４－２．８４（１Ｈ，ｍ），２．９７－３．０６（１Ｈ，ｍ），３．０９－３．２１（４Ｈ，ｍ），３．２５－３．３９（６Ｈ，ｍ），３．４５（４Ｈ，ｓ），３．５０－３．８０（８Ｈ，ｍ），４．４１－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｍ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５１－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１３－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８７（２Ｈ，ｍ），７．９３－８．０７（２Ｈ，ｍ），８．０９－８．２１（２Ｈ，ｍ），８．２６（１Ｈ，ｂｒｓ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１１３５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

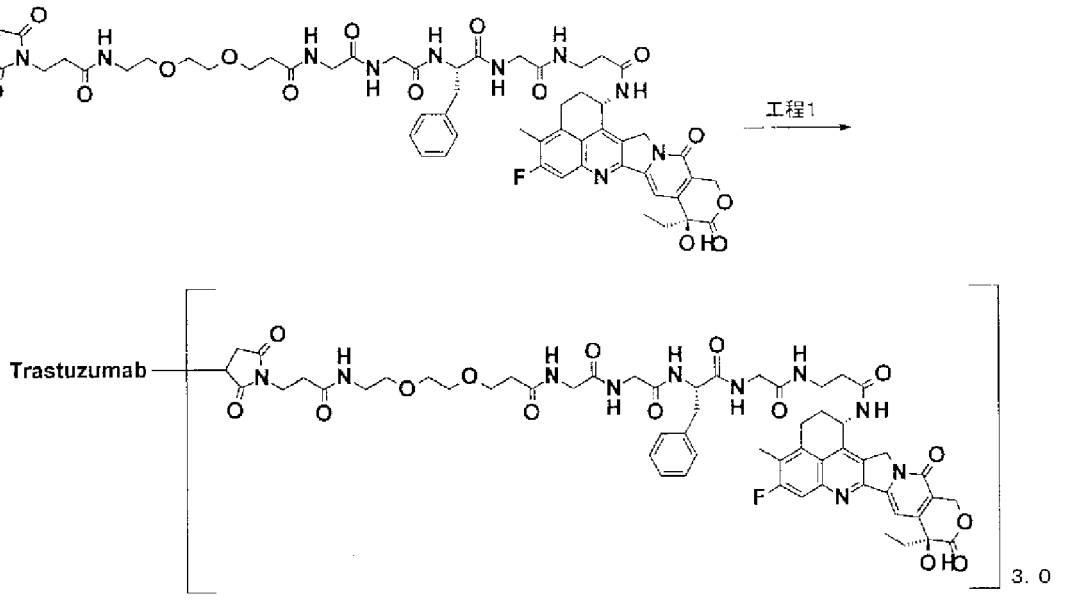
[0225] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（１９）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例６工程２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：１．６０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．６ｍｇ（７７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：１．９。

[0226] 実施例２０　抗体－薬物コンジュゲート（２０）

[化46]



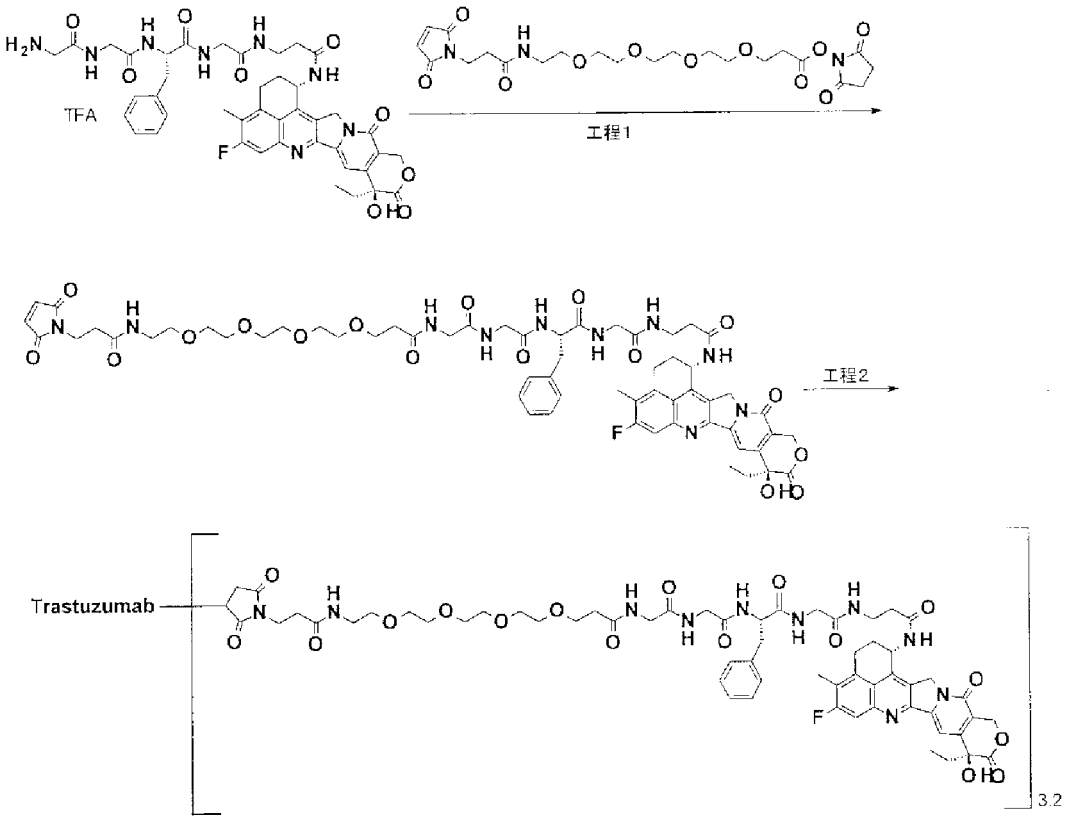
[0227] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２０）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例１９工程１で得た化合物を用いて、実施例７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：１．６９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．１ｍｇ（８１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０。

[0228] 実施例２１　抗体－薬物コンジュゲート（２１）

[化47]



[0229] 工程１：Ｎ－［１９－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１７－オキソ－４，７，１０，１３－テトラオキサ－１６－アザノナンデカン－１－オイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニルグリシル－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－β－アラニンアミド

実施例１５工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに１－マレインイミド－３－オキソ－７，１０，１３，１６－テトラオキサ－４－アザノナデカン酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（２３．０ｍｇ，２９％）を固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），１．８５（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．６，７．１Ｈｚ），２．０６－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．２８－２．４３（６Ｈ，ｍ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．４Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．１，３．９Ｈｚ），３．０９－３．２２（４Ｈ，ｍ），３．２７－３．４１（４Ｈ，ｍ），３．４７（１２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），３．５３－３．８１（１０Ｈ，ｍ），４．４１－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｂｒｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．２９（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８５（２Ｈ，ｍ），８．０３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），８．１１－８．２１（２Ｈ，ｍ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１２２４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

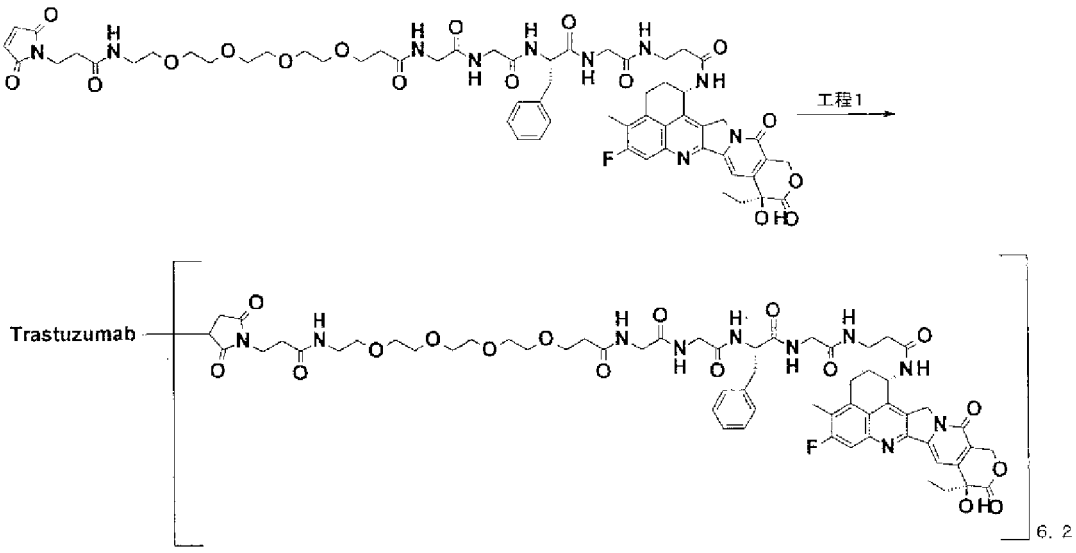
[0230] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（２１）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例６工程２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：１．７７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．６ｍｇ（８５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．２。

[0231] 実施例２２　抗体－薬物コンジュゲート（２２）

[化48]



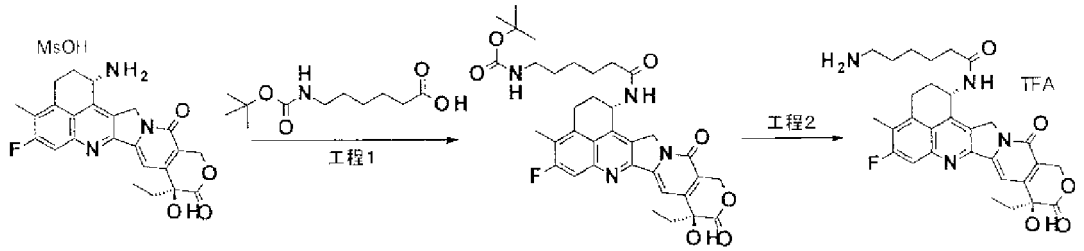
[0232] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２２）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例２１工程１で得た化合物を用いて、実施例７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：１．８９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．３ｍｇ（９０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２。

[0233] 実施例２３　中間体（２３）

[化49]



[0234] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（６－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－６－オキソヘキシル）カーバメート

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（０．５００ｇ，０．８８２ｍｍｏＬ）を、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ブタン酸の代わりに６－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）ヘキサン酸を用いて、実施例１工程１と同様に反応させ、標記化合物（０．６２０ｇ，定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），１．１４－１．２８（２Ｈ，ｍ），１．３１（９Ｈ，ｓ），１．４７－１．６１（２Ｈ，ｍ），１．７５－１．８９（２Ｈ，ｍ），２．０４－２．１７（４Ｈ，ｍ），２．３５（３Ｈ，ｓ），２．８１－２．８８（２Ｈ，ｍ），３．０９－３．１６（２Ｈ，ｍ），５．１０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．４Ｈｚ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．４Ｈｚ），５．３９（２Ｈ，ｓ），５．４８－５．５５（１Ｈ，ｍ），６．５０（１Ｈ，ｓ），６．７３－６．７８（１Ｈ，ｍ），７．２６（１Ｈ，ｓ），７．７４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．３９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ）．

[0235] 工程２：６－アミノ－Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］ヘキサンアミド

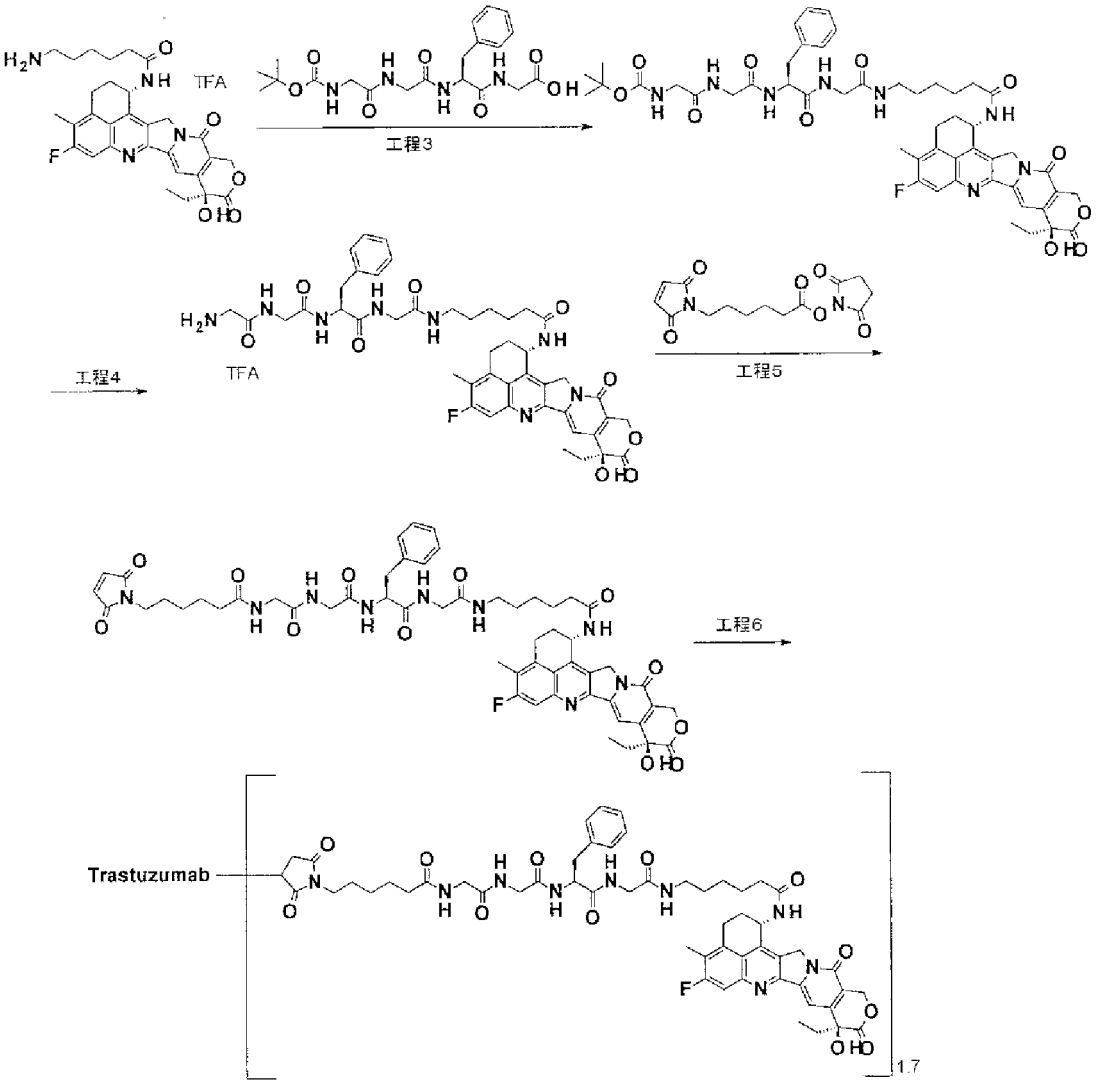
上記工程１で得た化合物（０．３９７ｇ，０．６１１ｍｍｏＬ）を、実施例１工程２と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（０．３４２ｇ，８４％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３１－１．４１（２Ｈ，ｍ），１．５２－１．７０（４Ｈ，ｍ），１．８０－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．１８（２Ｈ，ｍ），２．２１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．８１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），３．１０－３．２５（２Ｈ，ｍ），３．３３（２Ｈ，ｂｒｓ），５．１８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．８Ｈｚ），５．２２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．８Ｈｚ），５．４１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．６Ｈｚ），５

．４５（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．６Ｈｚ），５．５３－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．２Ｈｚ）．

[0236] 実施例２４　抗体－薬物コンジュゲート（２４）

[化50]



[0237] 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－（６－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミ

ノ｝－６－オキソヘキシル）グリシンアミド

実施例２３工程２で得た化合物（０．１７０ｇ，０．５１６ｍｍｏＬ）を、実施例２工程１と同様に反応させ、標記化合物（０．２２５ｇ，９１％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．４３－１．７０（６Ｈ，ｍ），１．８７（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１５．０，７．４Ｈｚ），２．１０－２．２２（３Ｈ，ｍ），２．２８－２．３７（１Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．７８－２．８５（１Ｈ，ｍ），３．０１－３．１０（３Ｈ，ｍ），３．１５－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．５４－３．６１（５Ｈ，ｍ），３．６２－３．６９（１Ｈ，ｍ），４．４４－４．５３（１Ｈ，ｍ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．２Ｈｚ），５．４５（２Ｈ，ｓ），５．５４－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．０２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．１Ｈｚ），７．１１－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．６３－７．６９（１Ｈ，ｍ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９０－７．９６（１Ｈ，ｍ），８．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ）．

[0238] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（６－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－６－オキソヘキシル）グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（０．１０５ｇ，０．１０８ｍｍｏＬ）を、実施例２工程２と同様に反応させ、標記化合物（０．０６８ｍｇ，６５％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．１５－１．６７（６Ｈ，ｍ），１．７９－１．９７（２Ｈ，ｍ），２

．０８－２．２４（４Ｈ，ｍ），２．４２（３Ｈ，ｓ），２．７６－２．８２（１Ｈ，ｍ），３．００－３．１０（５Ｈ，ｍ），３．１９（１Ｈ，ｓ），３．５０－３．６３（２Ｈ，ｍ），３．６４－３．７６（３Ｈ，ｍ），３．８４－３．９２（１Ｈ，ｍ），４．５１－４．５９（１Ｈ，ｍ），５．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．４Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１９．４Ｈｚ），５．４４（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｂｒｓ），７．１５－７．２９（５Ｈ，ｍ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．７２－７．７８（１Ｈ，ｍ），７．８２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９６－８．０８（２Ｈ，ｍ），８．３０－８．３８（２Ｈ，ｍ），８．４６－８．５６（２Ｈ，ｍ）．

[0239] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（６－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－６－オキソヘキシル）グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（５８ｍｇ，０．０６０ｍｍｏＬ）を、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（３９ｍｇ，６２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（CD_3OD）δ：０．９９（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．２７（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝１１．６，６．１Ｈｚ），１．３８－１．４４（２Ｈ，ｍ），１．５０－１．６３（６Ｈ，ｍ），１．６５－１．８０（２Ｈ，ｍ），１．８９－１．９８（２Ｈ，ｍ），２．１７－２．２５（３Ｈ，ｍ），２．２６－２．３６（３Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．９５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１４．３，９．２Ｈｚ），３．１２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，５．７Ｈｚ），３．１５－３．２５（４Ｈ，ｍ），３．４４（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），３．６５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），３．７６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），３．７９－３．８６（４Ｈ，ｍ），

４．４３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝８．９，６．０Ｈｚ），５．１０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．９Ｈｚ），５．３５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．６Ｈｚ），５．５６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１６．０Ｈｚ），５．６０－５．６４（１Ｈ，ｍ），６．７６（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．２４（６Ｈ，ｍ），７．５８（１Ｈ，ｓ），７．６０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．６８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0240] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（２４）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（９．０ｍＬ）を５０ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．１４０ｍＬ；抗体一分子に対して２．３当量）及び１Ｍリン酸水素カリウム二水溶液（０．４５０ｍＬ）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３の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．２８０ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を加え、２２℃で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、１００ｍＭＮＡＣ水溶液（０．０５５９ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、さらに２２℃で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、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得た。

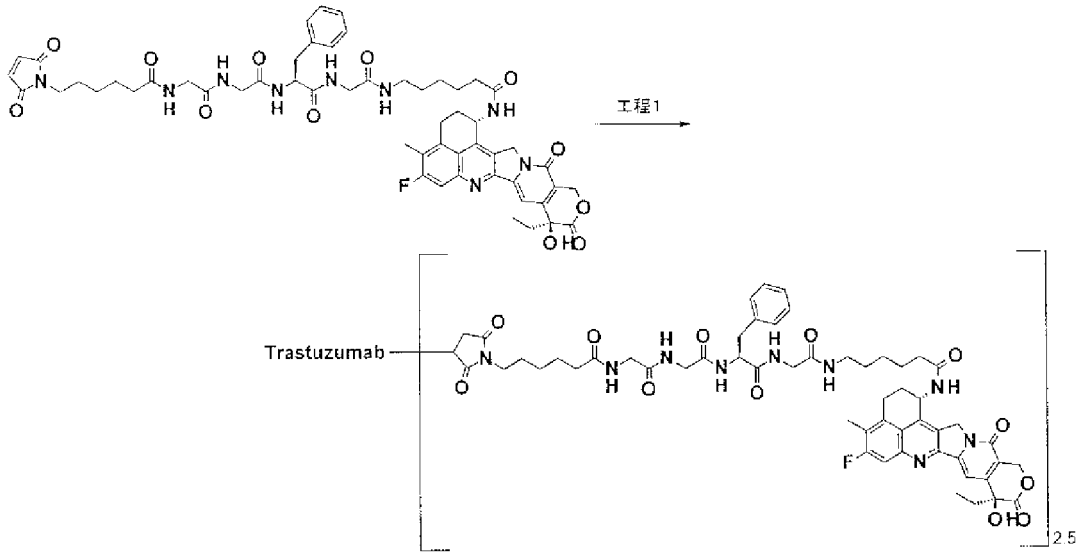
特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：３．３０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５３．５ｍｇ（５９％），抗

体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：１．７。

[0241] 実施例２５　抗体－薬物コンジュゲート（２５）

[化51]



[0242] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２５）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）を用いて、ＰＢＳ６．０／ＥＤＴＡにて１０ｍｇ／ｍＬに調製した。本溶液（９．０ｍＬ）を５０ｍＬチューブに採取し、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．２８０ｍＬ；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（０．４５０ｍＬ）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２４工程３の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．５５９ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃で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水溶液（０．１１２ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃で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。

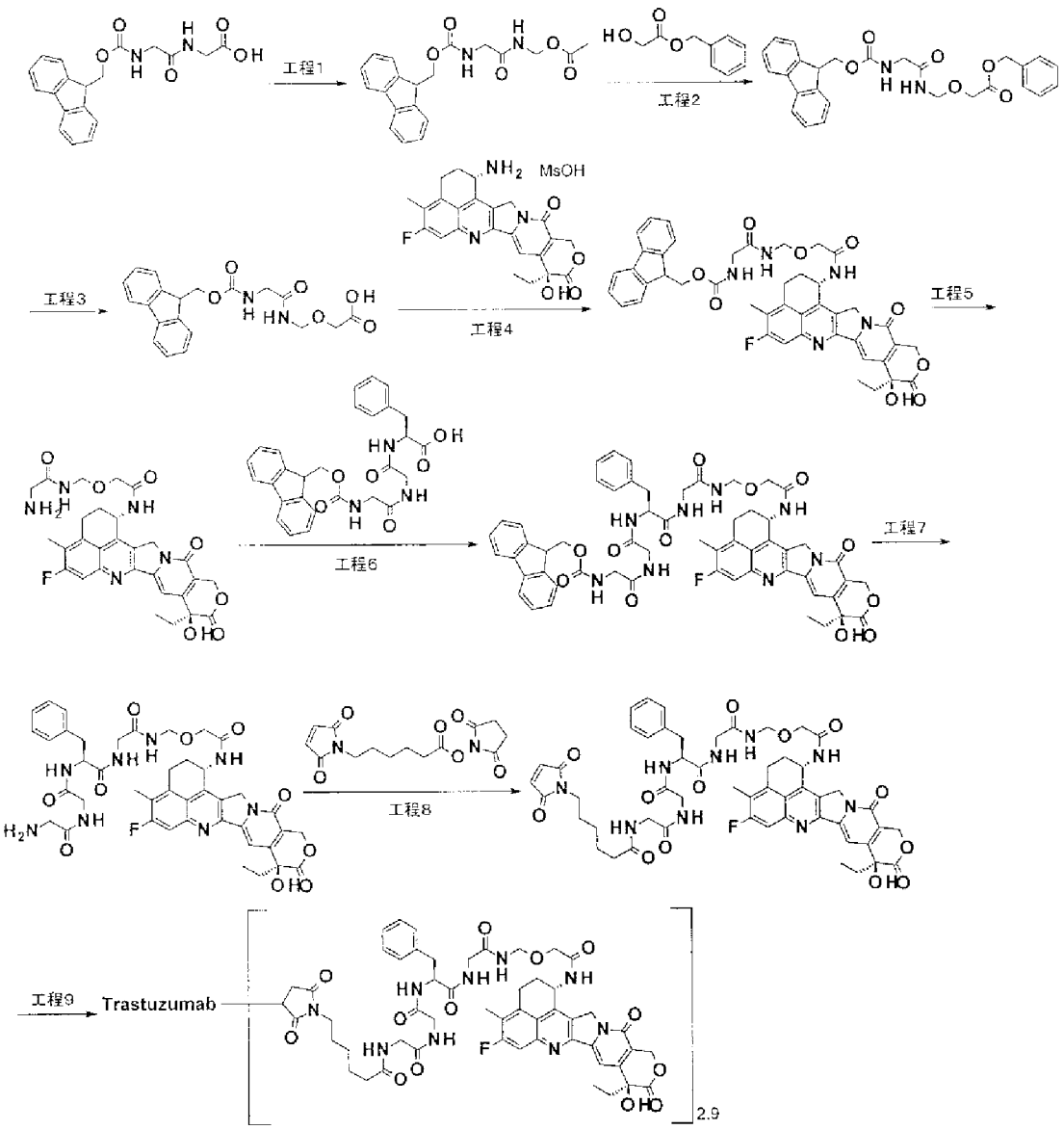
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ６．０を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を得た。

特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．６５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５５．１ｍｇ（６１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．５。

[0243] 実施例２６　抗体－薬物コンジュゲート（２６）

[化52]



[0244] 工程１：（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］

グリシル｝アミノ）メチルアセテート

Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニルグリシルグリシン（４．３３ｇ，１２．２ｍｍｏｌ）、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ；１２０ｍｌ）、及びトルエン（４０．０ｍｌ）からなる混合物に、ピリジン（１．１６ｍｌ，１４．７ｍｍｏｌ）及び四酢酸鉛（６．８４ｇ，１４．７ｍｍｏｌ）を加え、５時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却した後、不溶物をセライト濾過によって除き、減圧下濃縮した。得られた残留物を酢酸エチルに溶解し、水及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［ヘキサン：酢酸エチル＝９：１（ｖ／ｖ）～酢酸エチル］にて精製し、標記化合物（３．００ｇ，６７％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：２．０７（３Ｈ，ｓ），３．９０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），４．２３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），４．４６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），５．２６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），５．３２（１Ｈ，ｂｒｓ），６．９６（１Ｈ，ｂｒｓ），７．３２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．４１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．５９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），７．７７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ）．

[0245] 工程２：ベンジル　［（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシル｝アミノ）メトキシ］アセテート

上記工程１で得た化合物（３．６８ｇ，１０．０ｍｍｏＬ）及びベンジルグリコレート（４．９９ｇ，３０．０ｍｍｏＬ）のＴＨＦ（４０．０ｍＬ）溶液に、カリウム　ｔｅｒｔ－ブトキシド（２．２４ｇ，２０．０ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温で１５分間攪拌した。反応溶液に酢酸エチル、水を０℃で加え、酢酸エチル、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をジオキサン（４０．０ｍＬ）、水（１０．０ｍＬ）に溶解し、炭酸水素ナトリウム（１．０１ｇ，１２．０ｍｍｏＬ）、クロロギ酸９－フルオレニルメチル（２

．５９ｇ，１０．０ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０（ｖ／ｖ）～０：１００］にて精製し、無色油状の標記化合物（１．８８ｇ，４０％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：３．８４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），４．２４（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），４．４９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），４．８８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．１５－５．２７（１Ｈ，ｍ），５．１９（２Ｈ，ｓ），６．７４（１Ｈ，ｂｒｓ），７．３１－７．３９（７Ｈ，ｍ），７．４３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ）．

[0246] 工程３：［（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシル｝アミノ）メトキシ］酢酸

上記工程２で得た化合物（１．８８ｇ，３．９６ｍｍｏＬ）をエタノール（４０．０ｍＬ）、酢酸エチル（２０．０ｍｌ）に溶解した。パラジウム炭素触媒（３７６ｍｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で２時間攪拌した。不溶物をセライト濾過によって除き、溶媒を減圧留去し、標記化合物（１．５２ｇ，定量的）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：３．６２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），３．９７（２Ｈ，ｓ），４．１８－４．３２（３Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），７．２９－７．４６（４Ｈ，ｍ），７．５８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．７２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．９０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．７１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

[0247] 工程４：９Ｈ－フルオレン－９－イルメチル（２－｛［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１

２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，2－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］アミノ｝－２－オキソエチル）カーバメート

氷冷下、エキサテカンのメタンスルホン酸塩（０．２８３ｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（６１．４ｍｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）、及び上記工程３で得た化合物（０．２０５ｇ，０．５３３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（９２．９μＬ，０．５３３ｍｍｏＬ）及びＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１４３ｇ，０．６９３ｍｍｏＬ）を加え、室温で３日間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．３５２ｇ，８２％）を淡茶色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８１（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７３－１．８７（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２０（２Ｈ，ｍ），２．３４（３Ｈ，ｓ），３．０１－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．５８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），３．９８（２Ｈ，ｓ），４．１３－４．２５（３Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．０９－５．２２（２Ｈ，ｍ），５．３２－５．４２（２Ｈ，ｍ），５．５０－５．５９（１Ｈ，ｍ），６．４９（１Ｈ，ｓ），７．２４－７．３０（３Ｈ，ｍ），７．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．５３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．６６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８４（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），８．４７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ），８．７７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：８０２（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0248] 工程５：Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１

３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［3’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程４で得た化合物（０．８８１ｇ，１．１０ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１１．０ｍＬ）溶液に、ピペリジン（１．１ｍＬ）を加え、室温で２時間攪拌した。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。

[0249] 工程６：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－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［3’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

氷冷下、上記工程５で得た混合物（０．４３９ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１０１ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）、及び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；０．４４０ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５０．０ｍＬ）溶液に、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（０．１８１ｇ，０．８７８ｍｍｏＬ）を加え、室温で４日間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２６９ｇ，５８％）を淡橙色固体として得た。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０６３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0250] 工程７：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ

，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程６で得た化合物（０．２６９ｇ，０．２５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４．００ｍＬ）溶液に、ピペリジン（０．２５１ｍＬ，２．５３ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間攪拌した。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。

[0251] 工程８：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程７で得た化合物（０．２５３ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０．０ｍＬ）溶液に、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．１５６ｇ，０．５０６ｍｍｏＬ）を加え、室温で３日間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．１００ｇ，３８％）を淡黄色固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８３（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．０９－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．３３－１．４７（４Ｈ，ｍ），１．７５－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．００－２．２３（４Ｈ，ｍ），２．３６（３Ｈ，ｓ），２．６９－２．８１（１Ｈ，ｍ），２．９４－３．０３（１Ｈ，ｍ），３．０６－３．２２（２Ｈ，ｍ），３．２３－３．７４（６Ｈ，ｍ），３．９８（２Ｈ，ｓ），４．３９－４．５０（１Ｈ，ｍ），４．６０（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．１７（２Ｈ，ｓ），

５．３９（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５０（１Ｈ，ｓ），６．９６（２Ｈ，ｓ），７．１１－７．２４（５Ｈ，ｍ），７．２８（１Ｈ，ｓ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ），８．４８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ），８．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０３４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

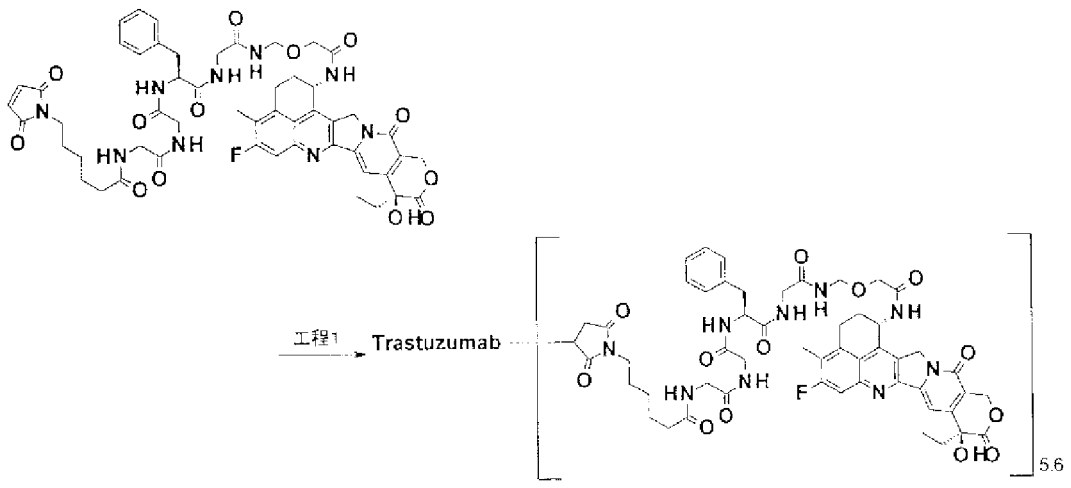
[0252] 工程９：抗体－薬物コンジュゲート（２６）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程８で得た化合物を用いて、実施例６工程２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：１．６１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．７ｍｇ（７７％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：２．９。

[0253] 実施例２７　抗体－薬物コンジュゲート（２７）

[化53]



[0254] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２７）

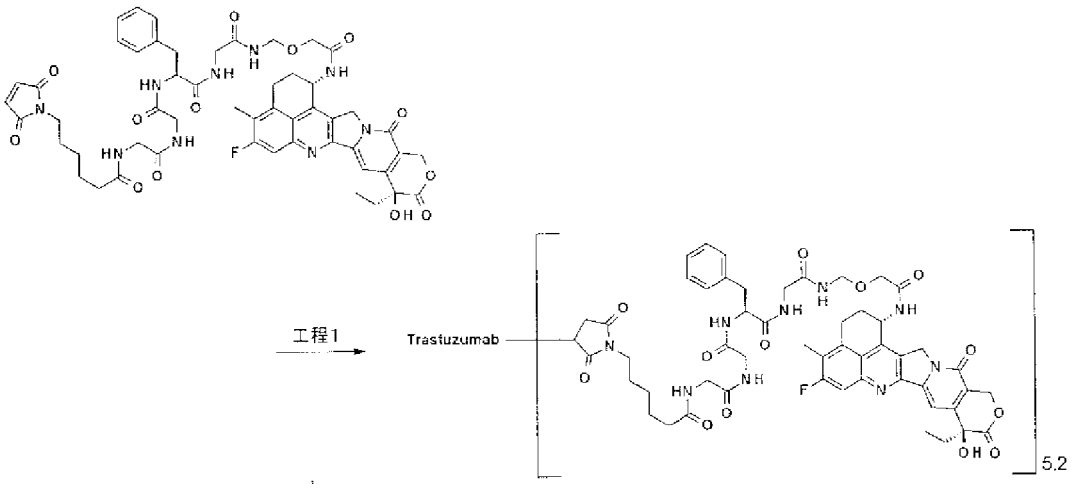
参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例２６工程８で得た化合物を用いて、実施例７工程１と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲ

ートを得た。

抗体濃度：１．５８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：９．５ｍｇ（７６％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．６。

[0255] 実施例２８　抗体－薬物コンジュゲート（２８）

[化54]



[0256] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２８）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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２本に入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．０３９ｍＬ；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（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、ＤＭＳＯ（０．０７２ｍＬ）と実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０７８ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を室温で加え、チューブ・ローテーターを用いて室温で４０分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合さ

せた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０１５５ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

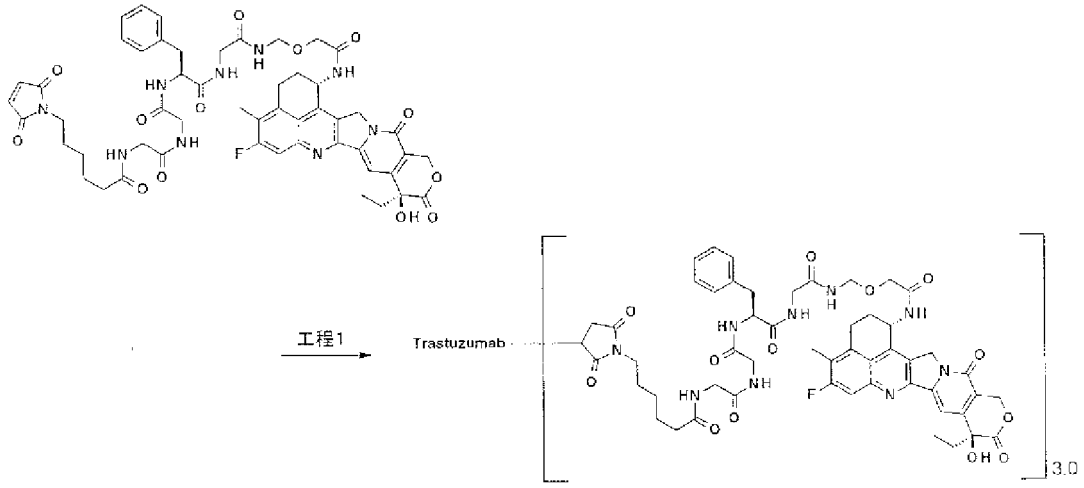
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を合わせ１１．７ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．６０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１８．７ｍｇ（９４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．２。

[0257] 実施例２９　抗体－薬物コンジュゲート（２９）

[化55]



[0258] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（２９）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（６ｍＬ）をポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．１０８ｍＬ；抗体一分子に対して２．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（０．０９１ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、ＤＭＳＯ（０．１４６ｍＬ）と実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．１９３ｍＬ；抗体一分子に対して４．５当量）を室温で加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０２９ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

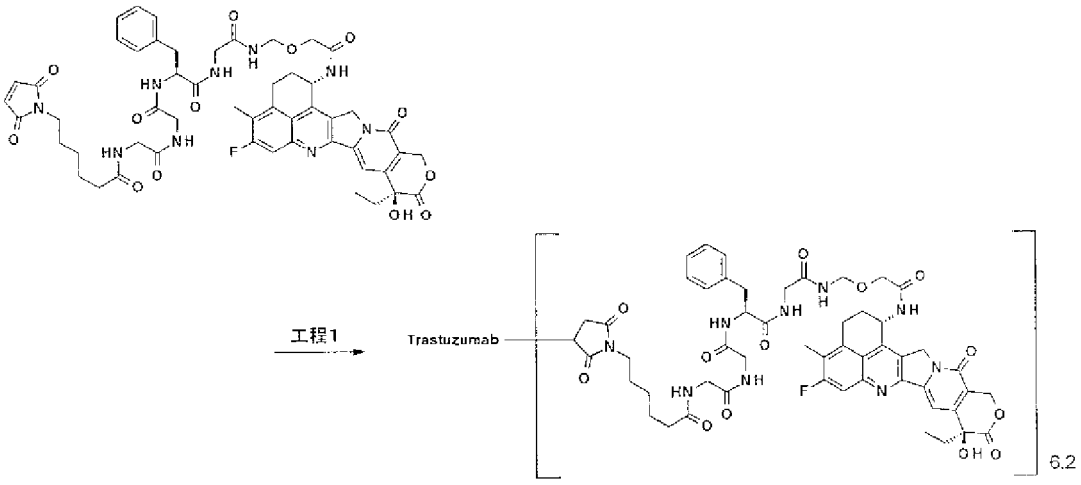
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を２４ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ及びＦ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．７７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４２ｍｇ（８５％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．０；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４。

[0259] 実施例３０　抗体－薬物コンジュゲート（３０）

[化56]



[0260] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３０）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（６ｍＬ）をポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．２１５ｍＬ；抗体一分子に対して５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（０．０９４ｍＬ）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で１時間インキュベートすることで、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元させた。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液へ、実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．３７０ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）を室温で加え、１５℃で１時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．０５６ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

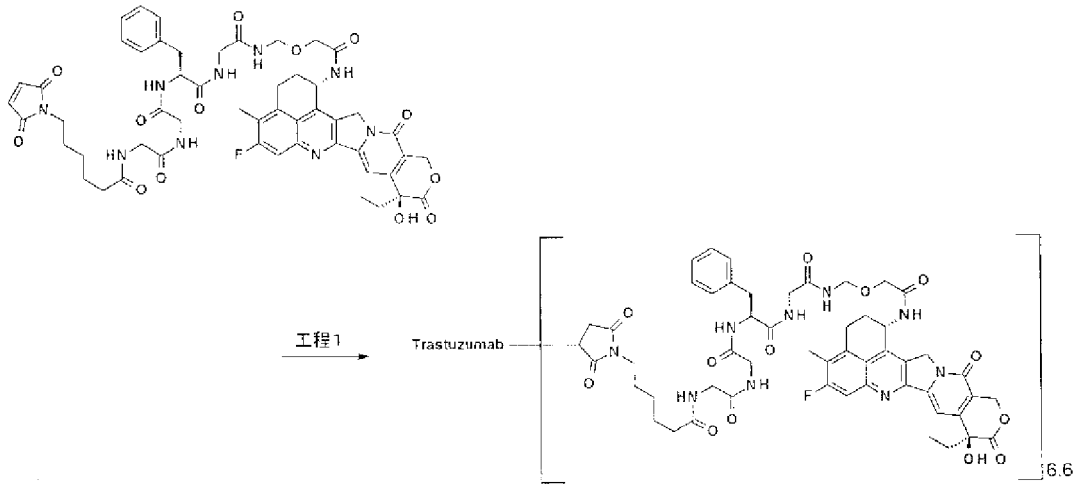
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を２４ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ及びＦ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１．９２ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４６ｍｇ（９２％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．１。

[0261] 実施例３１　抗体－薬物コンジュゲート（３１）

[化57]



[0262] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３１）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（５０．００ｍＬ）をポリプロピレン製容器に入れ、撹拌下、室温で１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（０．７４５ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（１．８６８ｍＬ；抗体一分子に対して５．４当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、撹拌を停止し、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した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、撹拌下、実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（２．９５８ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）をゆっくり滴下しながら加えた。１５℃のまま、最初の３０分間は撹拌し、次の１時間は撹拌を停止させてインキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．４４４ｍＬ）を加え、さらに室温で２０分間撹拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：撹拌下、上記溶液に２０％酢酸水（約０．２５ｍＬ）とＡＢＳ（５

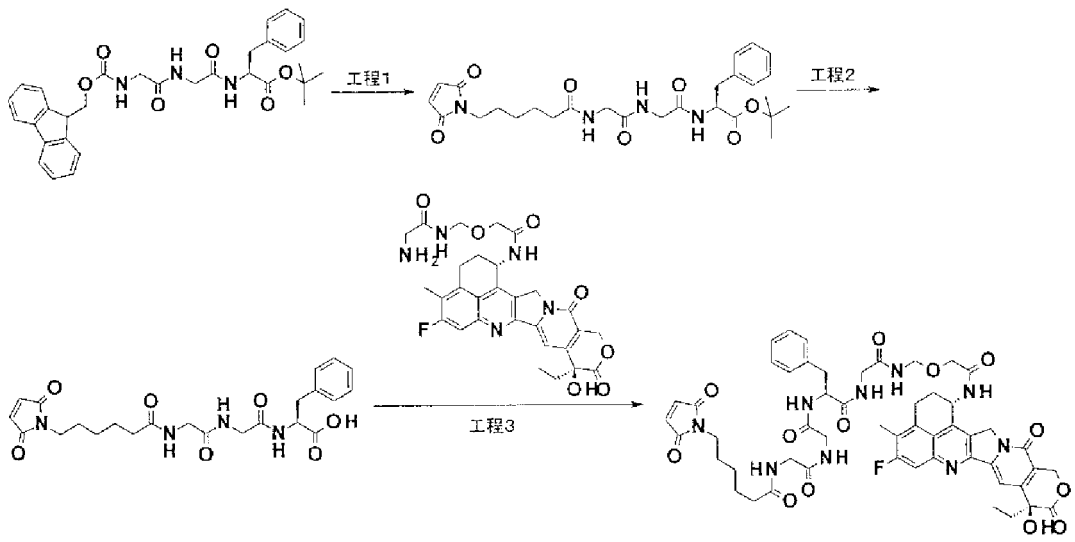
０ｍＬ）をゆっくり加え、本溶液のｐＨを５．５±０．１にした。この溶液を精密ろ過（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＨＶフィルター、０．４５μｍ、ＰＶＤＦ膜）して白濁物を除いた。この溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｂｉｏｍａｘ　５０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳ（計８００ｍＬ）を滴下しながら、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行った。得られた精製溶液に対して、精密ろ過（０．２２μｍ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶフィルター、ＰＶＤＦ膜）及び０．１０μｍ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＶＶフィルター、ＰＶＤＦ膜））を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を得た。

特性評価：共通操作Ｅ及びＦ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１１．２８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４５１ｍｇ（９０％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．６；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．７。

[0263] 実施例３２　（実施例２６工程８の化合物の別途合成法）

[化58]



[0264] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニネート

氷冷下、ｔｅｒｔ－ブチル　Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニネート（Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，１９９９年，５３巻，３９３項；０．４００ｇ，０．７１７ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（１２．０ｍｌ）溶液に、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］－７－ウンデセン（０．４００ｍｌ）を加えて室温で４日間攪拌した後、更に６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．２２１ｇ，０．７１７ｍｍｏＬ）を加え、３時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、１０％クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．２９５ｇ，７８％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：１．２８－１．３６（２Ｈ，ｍ），１．４１（９Ｈ，ｓ），１．５７－１．７１（４Ｈ，ｍ），２．２３（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），３．０９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），

３．５１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），３．８５－４．０２（４Ｈ，ｍ），４．６９－４．７８（１Ｈ，ｍ），６．１５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝４．６Ｈｚ），６．３３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），６．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．０Ｈｚ），６．６８（２Ｈ，ｓ），７．１０－７．１６（２Ｈ，ｍ），７．２２－７．３１（３Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５２９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0265] 工程２：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニン

上記工程１で得た化合物（０．２９５ｇ，０．５５８ｍｍｏＬ）のジクロロメタン（８．００ｍｌ）溶液に、トリフルオロ酢酸（４．００ｍＬ）を加え、室温で１８時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物（０．２４０ｇ，９１％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：１．１５－１．２３（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５３（４Ｈ，ｍ），２．１０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．８８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，８．９Ｈｚ），３．０４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，５．０Ｈｚ），３．３５－３．４３（２Ｈ，ｍ），３．５８－３．７７（４Ｈ，ｍ），４．４１（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝７．８，５．０Ｈｚ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１６－７．３１（５Ｈ，ｍ），８．００（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ）．

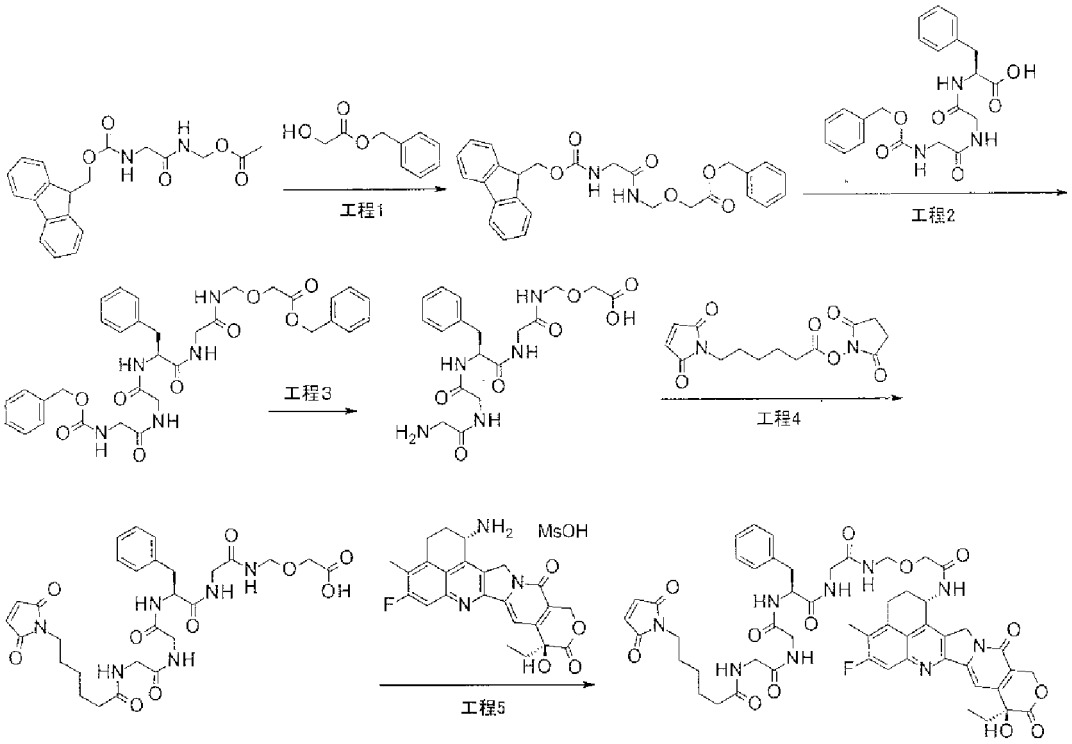
[0266] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（０．５７２ｇ，１．２１ｍｍｏＬ）をジクロロ

メタン（１２．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．１５２ｇ，１．３２ｍｍｏＬ）、及び１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（０．２５３ｇ，１．３２ｍｍｏＬ）を加えて１時間攪拌した。反応溶液を実施例２６工程５で得た混合物（１．１０ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２２．０ｍＬ）溶液に加え、室温で３時間攪拌した。反応溶液に１０％クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．３５１ｇ，３１％）を淡黄色固体として得た。機器データは、実施例２６工程８の化合物と同様であった。

[0267] 実施例３３　（実施例２６工程８の化合物の別途合成法）

[化59]



[0268] 工程１：ベンジル　［（｛Ｎ－［（９Ｈ－フルオレン－９－イルメトキシ）カルボニル］グリシル｝アミノ）メトキシ］アセテート

実施例２６工程１で得た化合物（７．３７ｇ，２０．０ｍｍｏＬ）のＴＨＦ（２００ｍｌ）溶液に、ベンジルグリコレート（６．６５ｇ，４０．０ｍｍｏＬ）、及びｐ－トルエンスルホン酸一水和物（０．３８１ｇ，２．００ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温で２時間３０分間攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［ヘキサン：酢酸エチル＝１００：０（ｖ／ｖ）～０：１００］にて精製し、標記化合物（６．７５ｇ，７１％）を無色固体として得た。機器データは、実施例２６工程２の化合物と同様であった。

[0269] 工程２：Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニン－Ｎ－｛［（２－（ベンジルオキシ）－２－オキソエトキシ］メチル｝グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（６．６０ｇ，１３．９ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１４０ｍＬ）溶液に、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］ウンデカ－７－エン（２．２２ｇ，１４．６ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温で１５分間攪拌した。反応溶液に、Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニン（６．３３ｇ，１５．３ｍｍｏＬ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（１．９２ｇ，１６．７ｍｍｏＬ）、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（３．２０ｇ，１６．７ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１４０ｍＬ）溶液を、あらかじめ室温で１時間攪拌した後に加え、室温で４時間攪拌した。反応溶液に０．１規定塩酸を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（７．１０ｇ，７９％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，

９．６Ｈｚ），３．０５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．５６－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．１５（２Ｈ，ｓ），４．４７－４．５５（１Ｈ，ｍ），４．６３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），５．０３（２Ｈ，ｓ），５．１５（２Ｈ，ｓ），７．１６－７．３８（１５Ｈ，ｍ），７．５２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），８．１７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．３６（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．６１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．６Ｈｚ）．

[0270] 工程３：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（カルボキシメトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（７．００ｇ，１０．８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２１６ｍＬ）溶液に、パラジウム炭素触媒（７．００ｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で２４時間攪拌した。不溶物をセライト濾過により除き、溶媒を減圧留去した。得られた残留物を水に溶解し、不溶物をセライト濾過により除き、溶媒を減圧留去する操作を２回繰り返し、標記化合物（３．７７ｇ，８２％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：２．８４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．７Ｈｚ），３．５０－３．７２（４Ｈ，ｍ），３．７７－３．８６（２Ｈ，ｍ），３．８７（２Ｈ，ｓ），４．５２－４．４３（１Ｈ，ｍ），４．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ），７．１２－７．３０（５Ｈ，ｍ），８．４３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．７０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），８．７９（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ）．

[0271] 工程４：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（カルボキシメトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程３で得た化合物（３．５９ｇ，８．４８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（８５．０ｍＬ）溶液に、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（２．８８ｇ，９．３３ｍｍｏＬ）、及びトリエチルア

ミン（０．８５８ｇ，８．４８ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間攪拌した。反応溶液に０．１規定塩酸を加え、クロロホルム、クロロホルムとメタノールの混合溶媒［クロロホルム：メタノール＝４：１（ｖ／ｖ）］で抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（３．７０ｇ，７１％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：１．１３－１．２４（２Ｈ，ｍ），１．４２－１．５３（４Ｈ，ｍ），２．１１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），２．８０（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．８Ｈｚ），３．０６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．５Ｈｚ），３．３７（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），３．５６－３．７８（６Ｈ，ｍ），３．９７（２Ｈ，ｓ），４．４６－４．５３（１Ｈ，ｍ），４．６１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１５－７．２９（５Ｈ，ｍ），８．０３－８．２０（３Ｈ，ｍ），８．３２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ）．

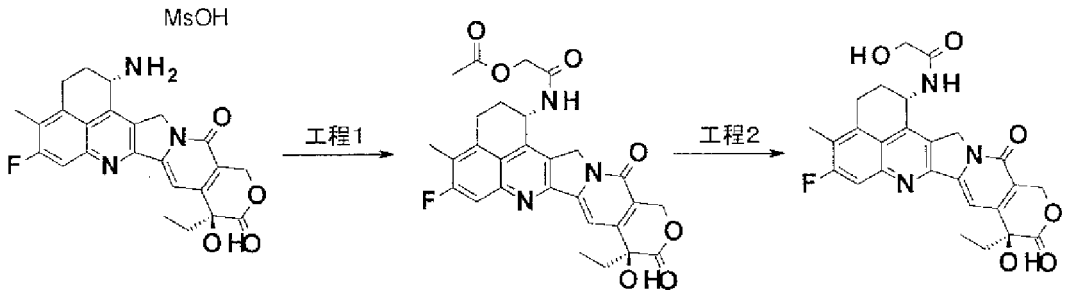
[0272] 工程５：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（１．１４ｇ，２．００ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（４０．０ｍＬ）溶液に、トリエチルアミン（０．２０２ｇ，２．００ｍｍｏＬ）、上記工程４で得た化合物（１．４８ｇ，２．４０ｍｍｏＬ）、及び１６．４％含水の４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリ

ド（０．９９３ｇ，３．００ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温で１時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝８：２（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（１．６９ｇ，８２％）を淡黄色固体として得た。機器データは、実施例２６工程８の化合物と同様であった。

[0273] 実施例３４　中間体（３４）

[化60]



[0274] 工程１：２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［3’，4’：6，7］インドリジノ［1，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエチルアセテート

氷冷下、エキサテカンのメタンスルホン酸塩（０．５００ｇ，０．９４１ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２０．０ｍＬ）懸濁液に、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．４９２ｍＬ，２．８２ｍｍｏＬ）及びアセトキシアセチルクロリド（０．１２１ｍｌ，１．１３ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．５０５ｇ，定量的）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．８１－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０８（３Ｈ，ｓ）

，２．０８－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．４１（３Ｈ，ｓ），３．１４－３．２１（２Ｈ，ｍ），４．５１（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１９．４，１４．７Ｈｚ），５．２２（２Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝４０．１，１９．０Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５６－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．６７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５３６（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0275] 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］－２－ヒドロキシアセトアミド

上記工程１で得た化合物（０．５０４ｇ，０．９４１ｍｍｏＬ）のメタノール（５０．０ｍＬ）懸濁液に、ＴＨＦ（２０．０ｍｌ）及び１規定水酸化ナトリウム水溶液（４．００ｍｌ，４．００ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間攪拌した。１規定塩酸（５．００ｍｌ，５．００ｍｍｏＬ）を加えて反応を停止し、溶媒を減圧留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（０．４１２ｇ，８９％）を淡黄色固体として得た。抗体－薬物コンジュゲート（４５）、（４６）をマウスに投与した際に、この化合物が腫瘍中で確認できた。

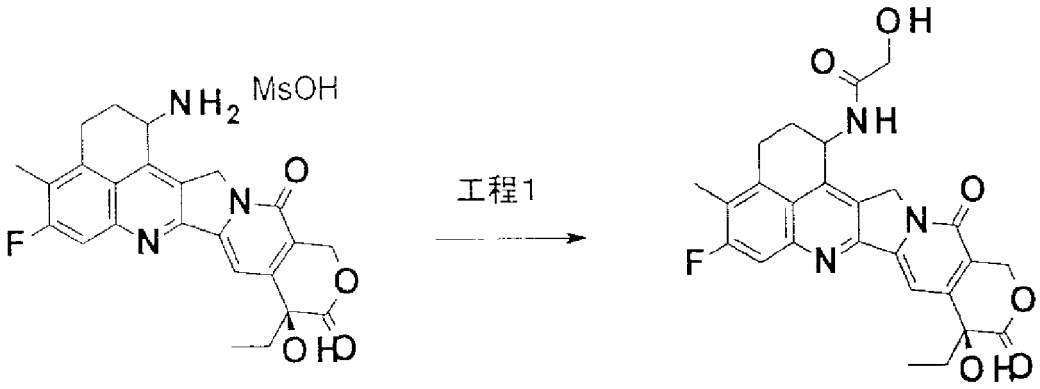
^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７８－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０９－２．２８（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），３．０７－３．２７（２Ｈ，ｍ），３．９６（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），５．１１－５．２６（２Ｈ，ｍ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．４６－５．５４（１Ｈ，ｍ），５．５５－５．６３（１Ｈ，ｍ），６．５２（１Ｈ，ｓ），７．３０（１Ｈ，ｓ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ

）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：４９４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0276] 実施例３５　（実施例３４の化合物の別途合成法）

[化61]

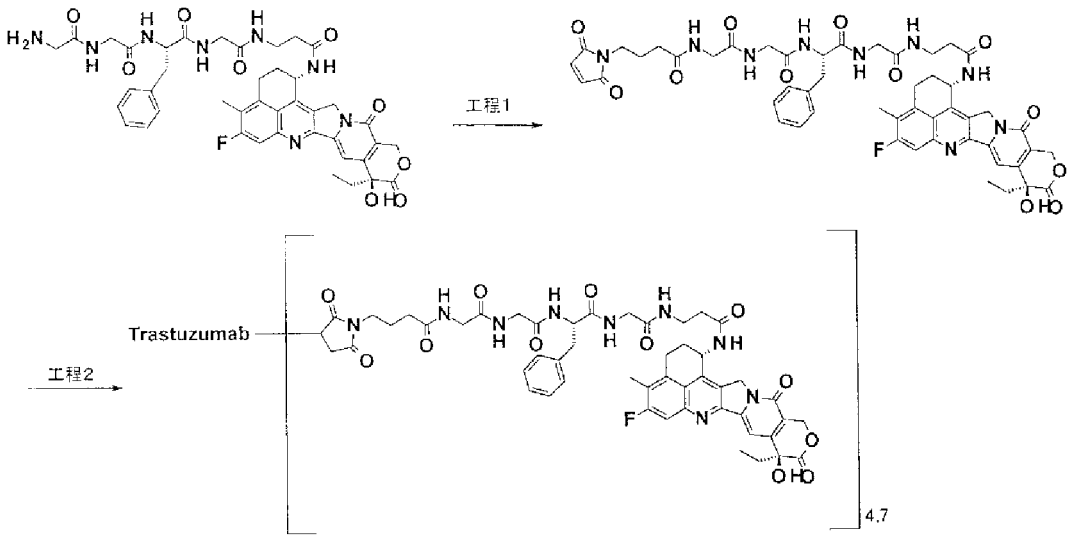


[0277] 工程１：Ｎ－［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］－２－ヒドロキシアセトアミド

グリコール酸（０．０２０１ｇ，０．２７ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．０３０２ｇ，０．２７ｍｍｏＬ）、及び１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（０．０５０８ｇ，０．２７ｍｍｏＬ）を加えて１時間攪拌した。反応溶液をエキサテカンのメタンスルホン酸塩（０．１ｇ，０．１７６ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．０ｍＬ）懸濁液に、トリエチルアミン（０．０２５ｍＬ，０．１８ｍｍｏＬ）を加え、室温で２４時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝１０：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．０８０ｇ，９２％）を淡黄色固体として得た。機器データは、実施例３４工程２で得た化合物と同様であった。

[0278] 実施例３６　抗体－薬物コンジュゲート（３６）

[化62]



[0279] 工程１：Ｎ－［４－（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］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１５の工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６４６ｍｍｏＬ）を、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジルの代わりに４－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルを用いて、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（２４．０ｍｇ，３８％）を淡白色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．６８（２Ｈ，ｑｕｉｎ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．７８－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２２（２Ｈ，ｍ），２．１０（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），２．３１－２．４３（２Ｈ，ｍ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，９．４Ｈｚ），３．０１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，４．７Ｈｚ），３．１７（４Ｈ，ｄ，Ｊ＝

５．１Ｈｚ），３．２９－３．４０（２Ｈ，ｍ），３．５２－３．８０（６Ｈ，ｍ），４．４０－４．５１（１Ｈ，ｍ），５．１９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．２６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５２－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７４－７．８４（２Ｈ，ｍ），８．０２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０８－８．１６（２Ｈ，ｍ），８．２５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：９９０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

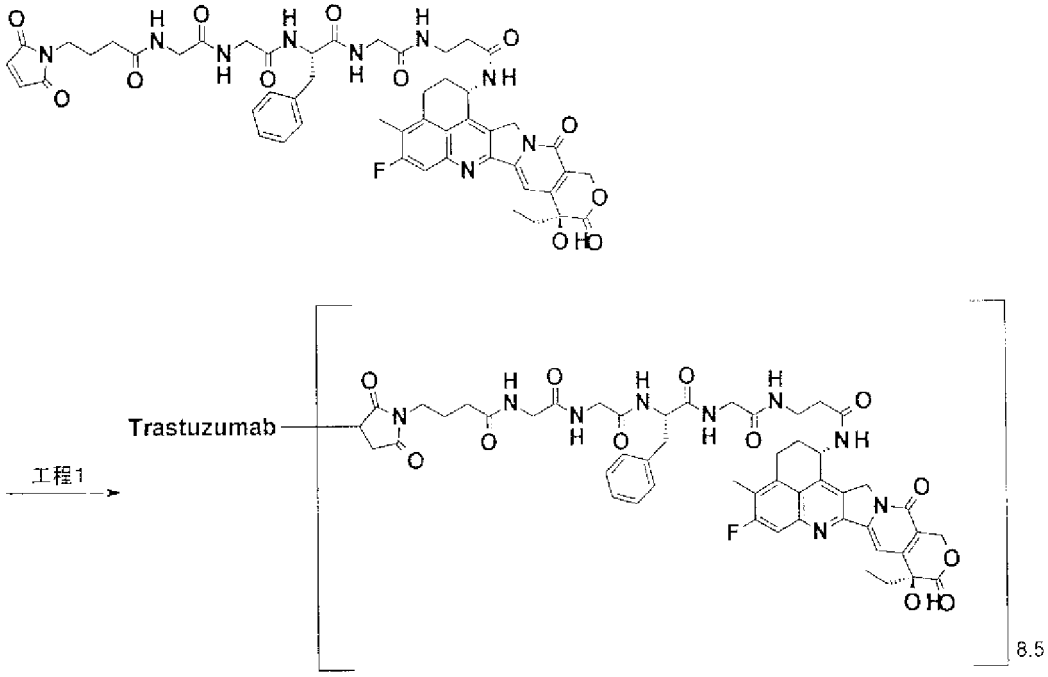
[0280] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（３３）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程１で得た化合物を用いて実施例６工程２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：１．７５ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１０．５ｍｇ（８４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：４．７。

[0281] 実施例３７　抗体－薬物コンジュゲート（３７）

[化63]



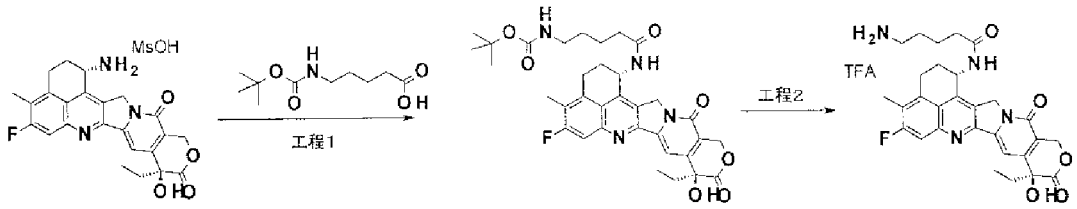
[0282] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（３７）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例３６工程１で得た化合物を用いて、実施例７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：１．８９ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１１．３ｍｇ（９０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：８．５。

[0283] 実施例３８　中間体（３８）

[化64]



[0284] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　（５－｛［（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｝－５－オキソペンチル）カーバメート

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（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５－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルアミノ）吉草酸を用いて、実施例１工程１と同様に反応させ、標記化合物（５７１ｍｇ，９６％）を黄茶色固体として得た。これ以上の精製はせず次の反応へ用いた。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：６３５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0285] 工程２：５－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］ペンタンアミド

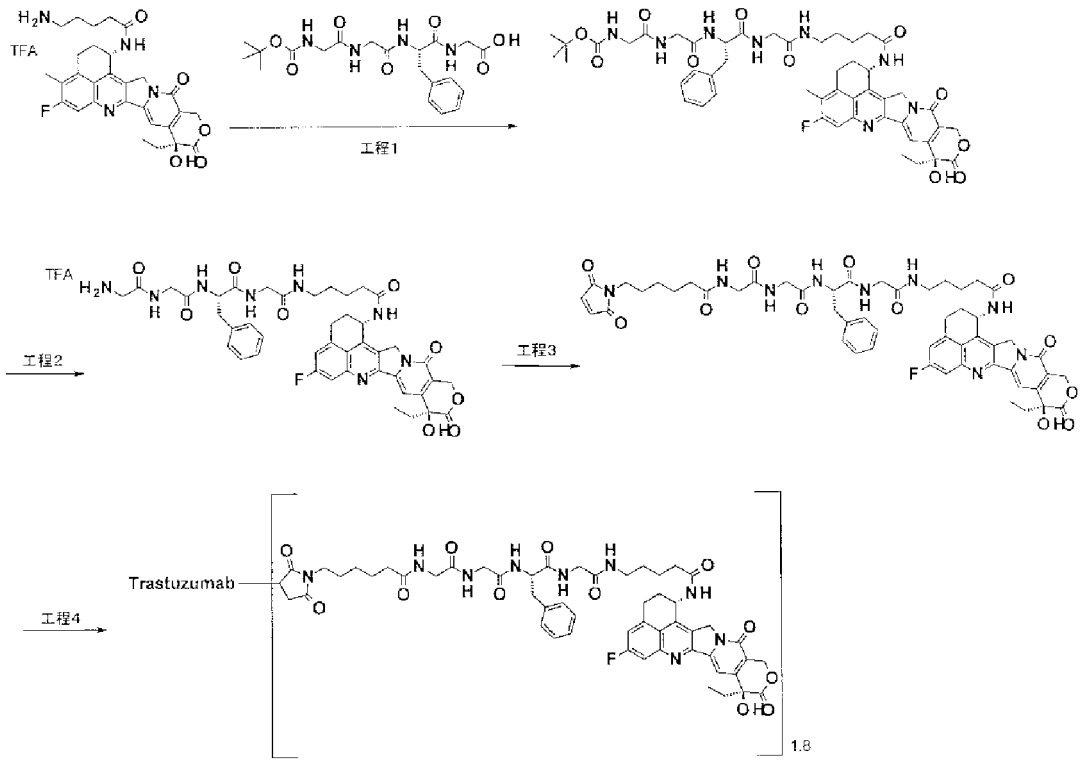
上記工程１で得た化合物（５５８ｍｇ，０．８７９ｍｍｏＬ）を、実施例１工程２と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（３６３ｍｇ，６４％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８８（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．５２－１．７１（４Ｈ，ｍ），１．８７（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．４，６．９Ｈｚ），２．０７－２．１８（２Ｈ，ｍ），２．２２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７６－２．８８（２Ｈ，ｍ），３．１３－３．２２（２Ｈ，ｍ），５．１８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６１（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．６５（３Ｈ，ｂｒ．ｓ．），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．３Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：５３５（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0286] 実施例３９　抗体－薬物コンジュゲート（３９）

[化65]



[0287] 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－（５－｛［（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｝－５－オキソペンチル）グリシンアミド

実施例３８工程２で得た化合物（３４８ｍｇ，０．５３７ｍｍｏＬ）を、実施例２工程１と同様に反応させ、標記化合物（４２９ｍｇ，８４％）を淡黄色固体として得た。これ以上の精製はせず次の反応へ用いた。

[0288] 工程２：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（５－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－５－オキソペンチル）グリシンアミド

上記工程１で得た化合物（４２７ｍｇ，０．４４８ｍｍｏＬ）を、実施例２工程２と同様に反応させ、標記化合物のトリフルオロ酢酸塩（４３０ｍｇ，９９％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），１．３８－１．４９（２Ｈ，ｍ），１．５４－１．６６（２Ｈ，ｍ），１．８６（２Ｈ，ｔｔ，Ｊ＝１４．５，７．０Ｈｚ），２．０８－２．１６（２Ｈ，ｍ），２．１９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，１０．０Ｈｚ），３．００－３．１２（３Ｈ，ｍ），３．１４－３．２１（２Ｈ，ｍ），３．５７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝４．７Ｈｚ），３．６０－３．７５（３Ｈ，ｍ），３．８７（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１６．８，５．９Ｈｚ），４．５５（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝９．０，４．７Ｈｚ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．４Ｈｚ），５．４４（２Ｈ，ｓ），５．５３－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５５（１Ｈ，ｓ），７．１４－７．２９

（５Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），７．８１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），７．９６（３Ｈ，ｂｒ．ｓ．），８．３０－８．３７（１Ｈ，ｍ），８．４４－８．５３（２Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：８５３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0289] 工程３：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－（５－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－５－オキソペンチル）グリシンアミド

上記工程２で得た化合物（６０．０ｍｇ，０．０６２１ｍｍｏＬ）を、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（１６．０ｍｇ，２５％）を固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．１３－１．２１（２Ｈ，ｍ），１．３６－１．５２（６Ｈ，ｍ），１．５３－１．６５（２Ｈ，ｍ），１．７９－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．１５（４Ｈ，ｍ），２．１９（２Ｈ，ｓ），２．４０（３Ｈ，ｓ），２．７９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，１０．２Ｈｚ），２．９８－３．１０（３Ｈ，ｍ），３．１２－３．２１（２Ｈ，ｍ），３．２９－３．３７（２Ｈ，ｍ），３．５３－３．７９（６Ｈ，ｍ），４．４１－４．５０（１Ｈ，ｍ），５．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．２３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４３（２Ｈ，ｓ），５．５２－５．６０（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１２－７．２８（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．６３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），７．８０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），８．０２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），８．０８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ）

，８．１２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．２４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０４６（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0290] 工程４：抗体－薬物コンジュゲート（３９）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）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水溶液（０．０１５５ｍＬ；抗体一分子に対して２．３当量）及び１Ｍリン酸水素カリウム二水溶液（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３で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０３１１ｍＬ；抗体一分子に対して４．６当量）を加え、２２℃で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水溶液（０．００６２２ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、さらに２２℃で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。

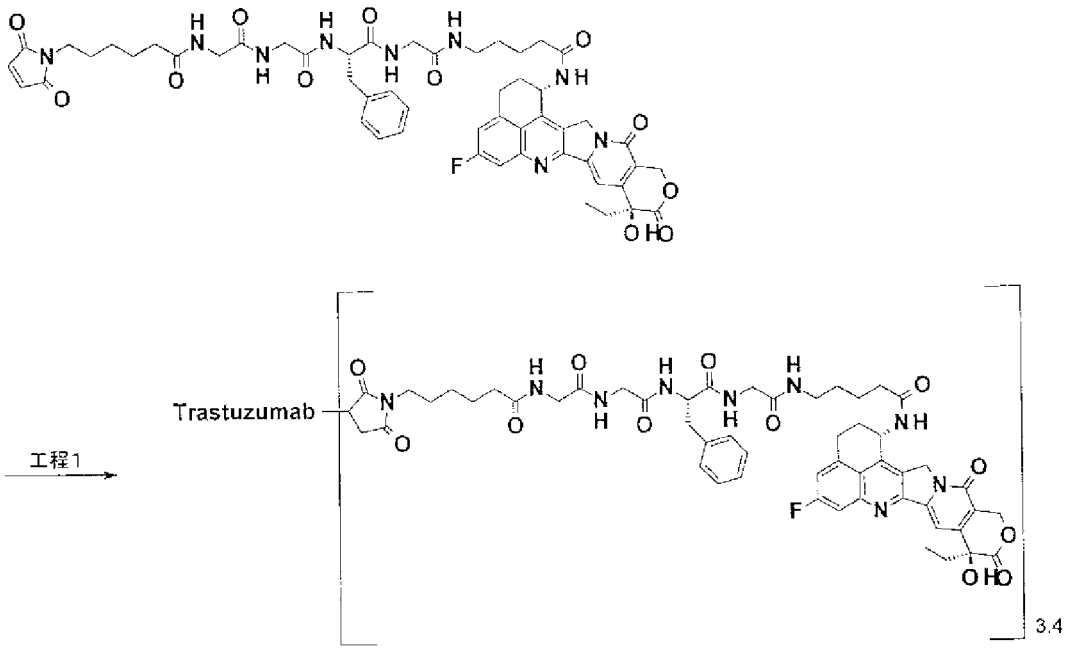
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ６．０を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ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）：１．８。

[0291] 実施例４０　抗体－薬物コンジュゲート（４０）

[化66]



[0292] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４０）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及び共通操作Ｂ（２８０ｎｍ吸光係数として１．３７ｍＬｍｇ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$を使用）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水溶液（０．０３１１ｍＬ；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（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工程３で得た化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．０６２２ｍＬ；抗体一分子に対して９．２当量）を加え、２２℃で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水溶液（０．０１２４ｍＬ；抗体一分子に対して１８．４当量）を加え、さらに２２℃で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。

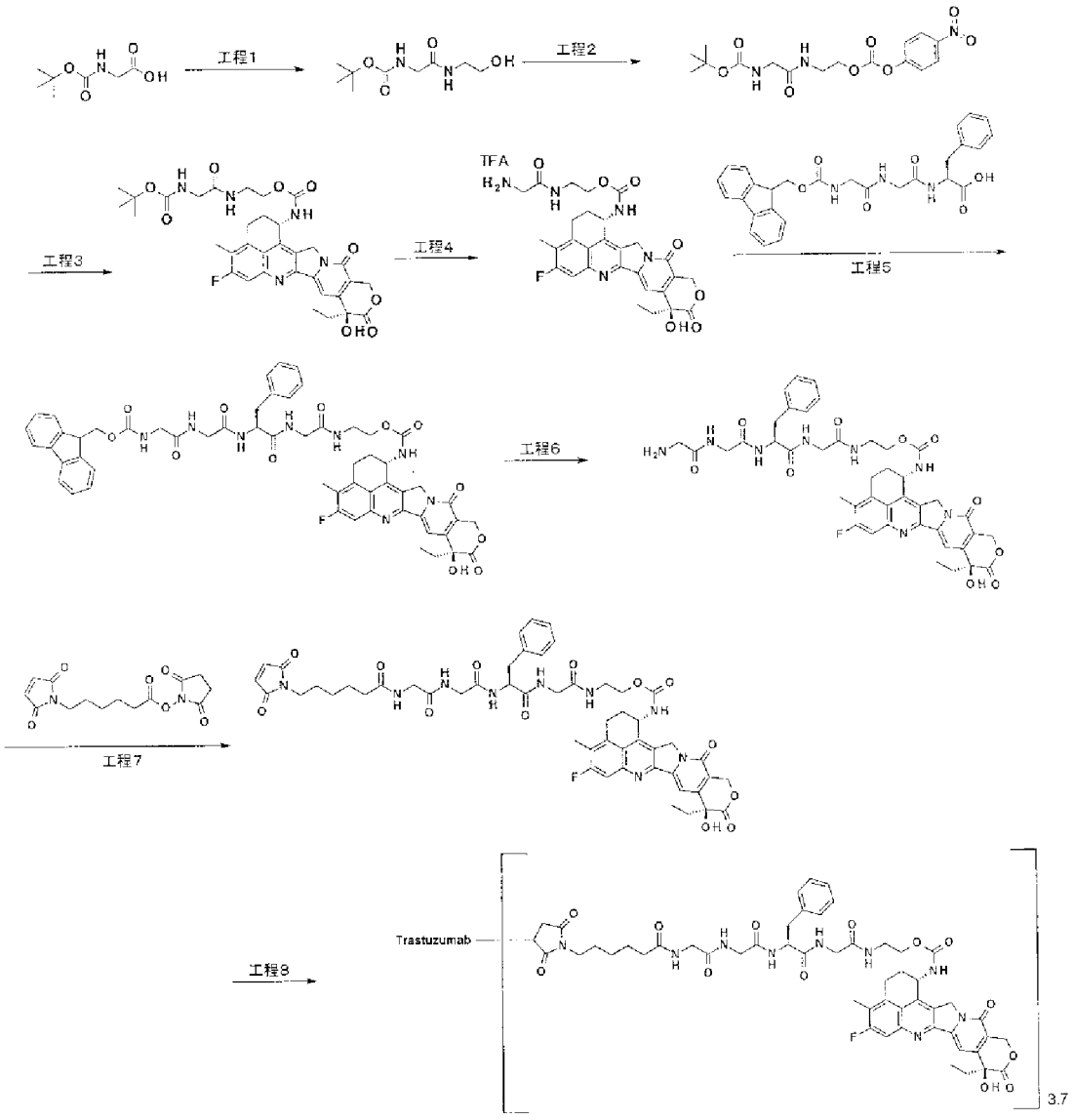
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ－１（緩衝液としてＰＢＳ６．０を使用）を用いた精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を６ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：０．９８ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５．８８ｍｇ（５９％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：３．４。

[0293] 実施例４１　抗体－薬物コンジュゲート（４１）

[化67]



[0294] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　｛２－［（２－ヒドロキシエチル）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（４．２ｇ，２４ｍｍｏｌ）をジメチルホルムアミド（４０ｍＬ）に溶解し、アミノエタノール（２．９ｇ，４８ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシベンズトリアゾール（３．７ｇ，２４ｍｍｏｌ）を加え、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（６．９ｇ，３６ｍｍｏＬ）を加えて室温で１２時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残留物にトルエンを加えて共沸させ、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［酢酸エチル～酢酸エチル：メタノール＝１０：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、無色油状の標記化合物（３．８ｇ，７２％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：１．４４（９Ｈ，ｓ），１．６９（１Ｈ，ｂｒｓ），３．４３（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝５．９，５．１Ｈｚ），３．７１（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），３．７９（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），５．２２（１Ｈ，ｂｒｓ），６．６２（１Ｈ，ｂｒｓ）．

[0295] 工程２：２－｛［Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシル］アミノ｝エチル４－ニトロフェニルカーボネート

上記工程１で得た化合物（１．０ｇ，４．５９ｍｍｏＬ）のＴＨＦ（２３ｍＬ）溶液に、ジイソプロピルエチルアミン（０．８０ｍＬ，４．５９ｍｍｏｌ）、炭酸ビス（４－ニトロフェニル）（１．３２ｇ，６．８８ｍｍｏＬ）を加え、室温で１２時間攪拌した。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［ヘキサン～ヘキサン：酢酸エチル＝１：３（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（１．１３ｇ，６４％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：１．４４（１Ｈ，ｓ），３．６６（２Ｈ，ｔｄ，Ｊ＝５．１，５．９Ｈｚ），３．８１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），４．３６（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．１Ｈｚ），５．０７（１Ｈ，ｓ），６．４８－６．５３（１Ｈ，ｍ），７．３８（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝９．９，２．７Ｈｚ），８．２７（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝９．９，２．７Ｈｚ）．

[0296] 工程３：２－（｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］アセチル｝アミノ）エチル［（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］カーバメート

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（０．７０ｇ，１．２ｍｍｏＬ）、上記工程２で得た化合物（０．５７ｇ，１．５ｍｍｏＬ）、１－ヒドロキシベンズトリアゾール（３．７ｇ，２４ｍｍｏｌ）にジメチルホルムアミド（２３ｍＬ）を加え、ジイソプロピルエチルアミン（０．４３ｍＬ，２．５ｍｍｏｌ）を加えて室温で１２時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残留物にトルエンを加えて共沸させ、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝１０：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（０．８６ｇ，定量的）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－$ｄ_{6}$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），１．３５（９Ｈ，ｓ），１．７８－１．９４（１Ｈ，ｍ），２．０７－２．１７（１Ｈ，ｍ），２．１７－２．２７（１Ｈ，ｍ），２．３７（３Ｈ，ｓ），３．０５－３．１６（１Ｈ，ｍ），３．１９－３．２６（１Ｈ，ｍ），３．３４－３．３９（２Ｈ，ｍ），３．５０－３．５６（２Ｈ，ｍ），４．００－４．０７（１Ｈ，ｍ），４．１３－４．２１（１Ｈ，ｍ），５．１５－５．３４（３Ｈ，ｍ），５．４４（２Ｈ，ｓ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．９０－６．９６（１Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９３－８．０７（２Ｈ，ｍ）．

[0297] 工程４：２－（グリシルアミノ）エチル［（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］カーバメート

上記工程３で得た化合物（０．８６ｇ，２．１ｍｍｏＬ）をジクロロメタン（１５ｍＬ）に溶解した。トリフルオロ酢酸（１５ｍＬ）を加えて１時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残留物にトルエンを加えて共沸させ、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（０．８６ｇ，９９％）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），１．７９－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．１８（１Ｈ，ｍ），２．１８－２．２９（１Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），３．０７－３．１７（１Ｈ，ｍ），３．２０－３．２９（１Ｈ，ｍ），３．３６－３．５０（２Ｈ，ｍ），３．５１－３．６２（２Ｈ，ｍ），３．９９－４．０８（１Ｈ，ｍ），４．２２－４．３１（１Ｈ，ｍ），５．１６－５．３５（３Ｈ，ｍ），５．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），５．４６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１８．８Ｈｚ），６．５６（１Ｈ，ｓ），７．３４（１Ｈ，ｓ），７．６５（２Ｈ，ｂｒｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），７．９９－８．０６（１Ｈ，ｍ），８．５１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：９３９（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0298] 工程５：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－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］カルバモイル｝オキシ）エチル］グリシンアミド

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；０．２１ｇ，０．４１ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（３ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（０．０５２ｇ，０．４５ｍｍｏＬ）、及

び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（０．０８６ｇ，０．４５ｍｍｏＬ）を加えて１時間攪拌した。反応溶液を上記工程４で得た化合物（０．２４ｇ，０．３５ｍｍｏｌ）、及びトリエチルアミン（０．０７８ｍＬ、０．４５ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（２ｍＬ）に滴下し、室温で１時間攪拌した。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（０．２４ｇ，６５％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：０．８６（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．７９－１．９０（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．２７（２Ｈ，ｍ），２．３６（３Ｈ，ｓ），２．７３－２．８１（１Ｈ，ｍ），２．９８－３．１２（２Ｈ，ｍ），３．１７－３．２６（１Ｈ，ｍ），３．３５－３．４２（２Ｈ，ｍ），３．５５－３．７９（６Ｈ，ｍ），４．００－４．１０（１Ｈ，ｍ），４．１２－４．２３（２Ｈ，ｍ），４．２３－４．２９（２Ｈ，ｍ），４．４５－４．５５（１Ｈ，ｍ），５．１３－５．３３（３Ｈ，ｍ），５．４０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．４４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．１１－７．２６（５Ｈ，ｍ），７．２６－７．３３（３Ｈ，ｍ），７．３８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），７．５７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．９Ｈｚ），７．６８（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ），７．７７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．８５（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ），７．９１－７．９７（１Ｈ，ｍ），７．９８－８．０５（２Ｈ，ｍ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．３１－８．２６（１Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０６３（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0299] 工程６：グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１

，２－ｂ］キノリン－１－イル］カルバモイル｝オキシ）エチル］グリシンアミド

上記工程５で得た化合物（０．２４ｇ，０．３５ｍｍｏｌ）を、実施例２６工程７と同様に反応させ、標記化合物（０．１２ｇ，６５％）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），１．７８－１．９４（２Ｈ，ｍ），２．０６－２．２７（２Ｈ，ｍ），２．３７（３Ｈ，ｓ），２．７２－２．８１（１Ｈ，ｍ），２．９８－３．０７（１Ｈ，ｍ），３．１２－３．１７（２Ｈ，ｍ），３．５７－３．８１（６Ｈ，ｍ），４．００－４．２１（３Ｈ，ｍ），４．４５－４．５４（１Ｈ，ｍ），５．１５－５．３５（３Ｈ，ｍ），５．４１（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），５．４５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１７．２Ｈｚ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．１１－７．２６（６Ｈ，ｍ），７．３２（１Ｈ，ｓ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），７．９３－８．００（１Ｈ，ｍ），８．０３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．４Ｈｚ），８．０６－８．１３（１Ｈ，ｍ），８．２１－８．２７（２Ｈ，ｍ），８．３０－８．３６（１Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：８４１（Ｍ＋Ｈ）$^+$

[0300] 工程７：Ｎ－［６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノイル］グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［２－（｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］カルバモイル｝オキシ）エチル］グリシンアミド

上記工程６で得た化合物（４２．０ｍｇ，０．０４９９ｍｍｏＬ）を、実施例２工程３と同様に反応させ、標記化合物（３８．３ｍｇ，７４％）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），１．１２－１．２３（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．８０－１．９５（２Ｈ，ｍ），２．０５－２．２７（４Ｈ，ｍ），２．３８（３Ｈ，ｓ），３．４３－２．４０（８Ｈ，ｍ），３．５３－３．７８（６Ｈ，ｍ），４．００－４．２１（２Ｈ，ｍ），４．４４－４．５５（１Ｈ，ｍ），５．１７－５．３６（３Ｈ，ｍ），５．４３（２Ｈ，ｓ），６．５４（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１９（５Ｈ，ｄ，Ｊ＝２３．９Ｈｚ），７．３３（１Ｈ，ｓ），７．７８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．６Ｈｚ），７．９１－８．１６（５Ｈ，ｍ），８．２４－８．３１（１Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ：１０３４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

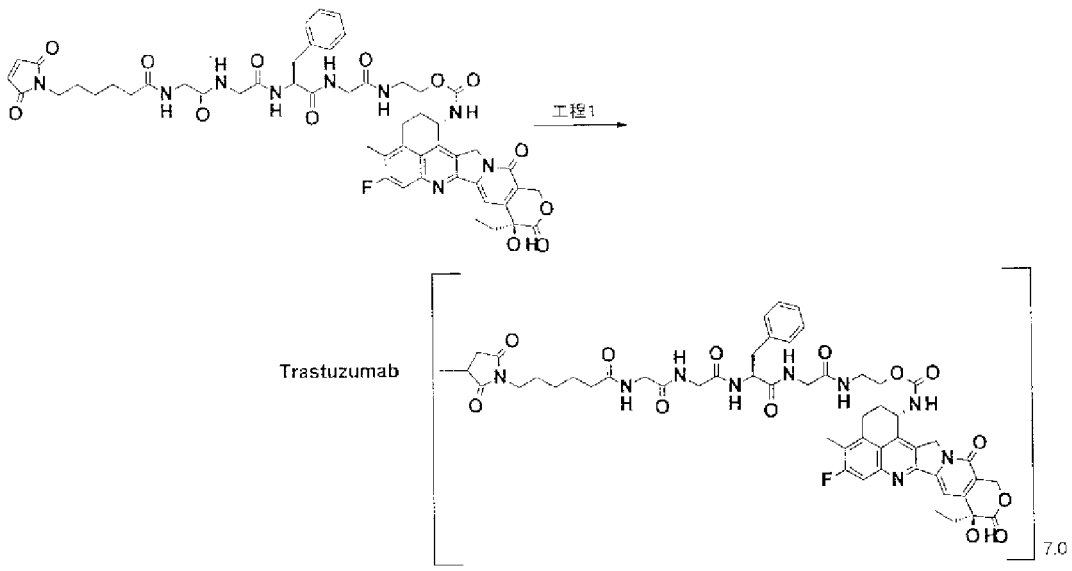
[0301] 工程８：抗体－薬物コンジュゲート（４１）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程７で得た化合物を用いて、実施例６工程２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：１．５４ｍｇ／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）：３．７。

[0302] 実施例４２　抗体－薬物コンジュゲート（４２）

[化68]



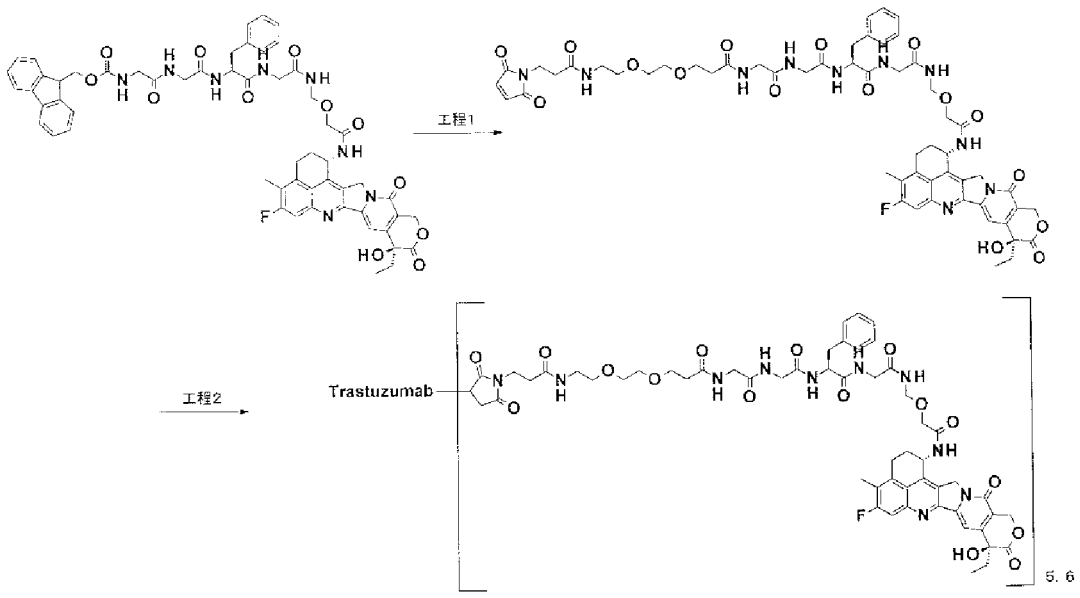
[0303] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４２）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び実施例４１工程７で得た化合物を用いて、実施例７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：１．４７ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：８．８ｍｇ（７１％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．０。

[0304] 実施例４３　抗体－薬物コンジュゲート（４３）

[化69]



[0305] 工程１：Ｎ－｛３－［２－（２－｛［３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール１－イル）プロパノイル］アミノ｝エトキシ）エトキシ］プロパノイル｝グリシルグリシル－Ｌ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

実施例２６工程６で得た化合物（５３．７ｍｇ，５０．５μｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１．５０ｍＬ）に溶解し、１，８－ジアザビ

シクロ（５．４．０）－７－ウンデセン（７．５μＬ，５０．５μｍｏＬ）を加え、室温で３０分攪拌した。反応溶液にｐ－トルエンスルホン酸ピリジニウム（１４．０ｍｇ，５．５６μｍｏＬ）を加えた後、３－（２－（２－（３－マレインイミドプロパンアミド）エトキシ）エトキシ）プロパン酸Ｎ－スクシンイミジル（３２．３ｍｇ，７５．８μｍｏＬ）を加え、室温で２．２５時間攪拌した。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（２７．１ｍｇ，４７％）を淡黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ６）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），１．７９－１．９１（２Ｈ，ｍ），２．１８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝１５．１Ｈｚ），２．２９－２．３３（４Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７６（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，９．２Ｈｚ），３．０２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．７，３．９Ｈｚ），３．１３－３．１５（２Ｈ，ｍ），３．４４－３．４６（６Ｈ，ｍ），３．５７－３．５９（６Ｈ，ｍ），３．６９－３．７５（６Ｈ，ｍ），４．０１（２Ｈ，ｓ），４．４６－４．４８（１Ｈ，ｍ），４．６３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），５．２１（２Ｈ，ｓ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．６０（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．５，５．７Ｈｚ），６．５４（１Ｈ，ｓ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１７－７．２４（６Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ），８．００－８．０２（２Ｈ，ｍ），８．１３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ），８．１７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），８．５２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ），８．６５（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ）．

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ＝１１５１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

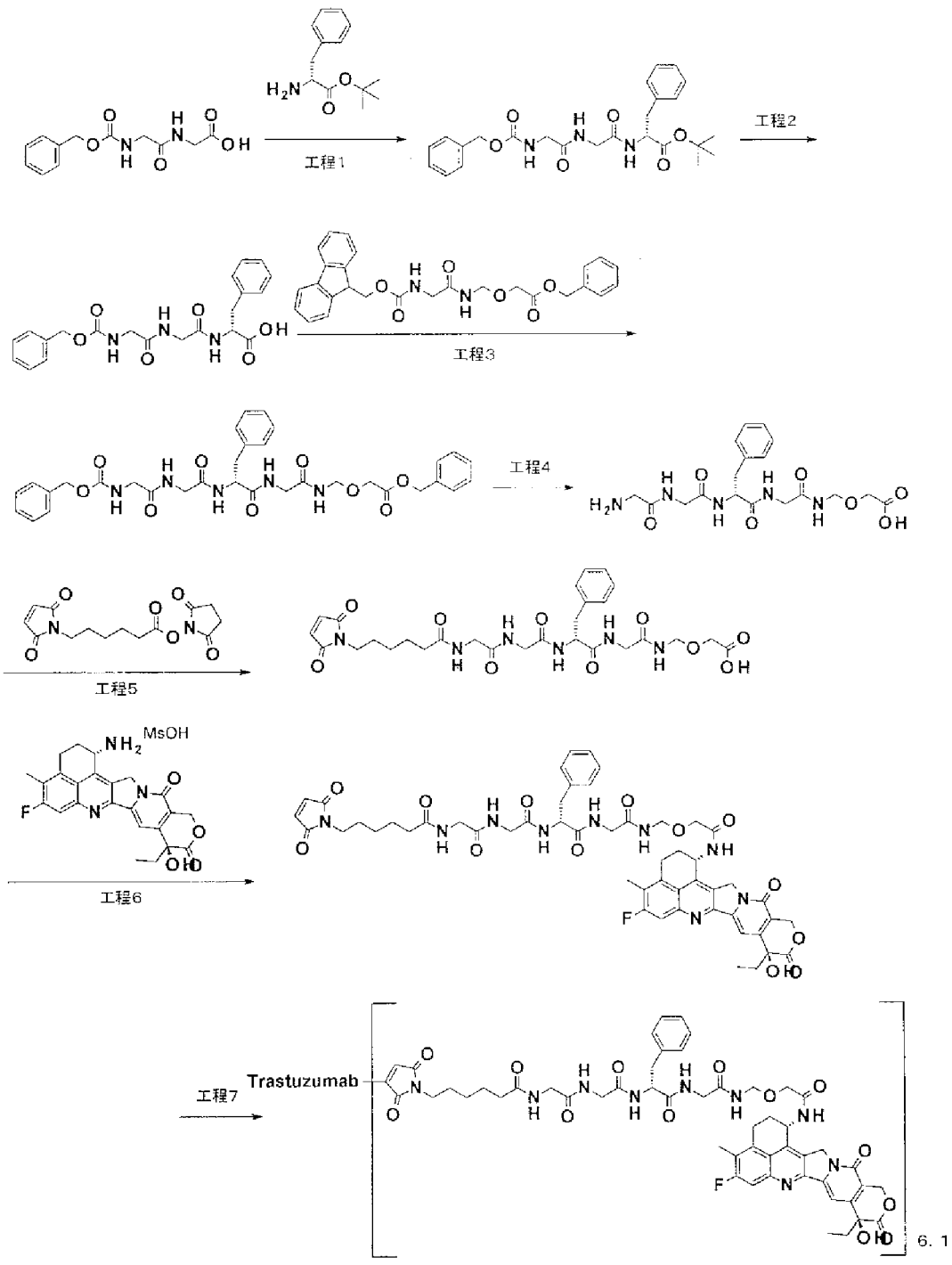
[0306] 工程２：抗体－薬物コンジュゲート（４３）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程１で得た化合物を用いて、実施例７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：１．９６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１７．６ｍｇ（８８％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：５．６。

[0307] 実施例４４　抗体－薬物コンジュゲート（４４）

[化70]



[0308] 工程１：ｔｅｒｔ－ブチル　Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシ

ルグリシル－Ｄ－フェニルアラニンエート

Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシン（３．００ｇ，１１．３ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２０．０ｍＬ）に溶解し、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（１．４３ｇ，１２．４ｍｍｏＬ）、及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（２．３７ｇ，１２．４ｍｍｏＬ）を加えて１時間攪拌した。その反応溶液にD-フェニルアラニンｔｅｒｔ－ブチル（２．７４ｇ，１２．３８ｍｍｏＬ）及びトリエチルアミン（１．７３ｍＬ，１２．４ｍｍｏＬ）を加えたＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド溶液（１０ｍＬ）を滴下し、室温で２時間攪拌した。反応液にジクロロメタンを加え、水、１規定塩酸及び飽和重曹水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（４．２１ｇ，８０％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：１．４１（９Ｈ，ｓ），３．０３－３．１４（２Ｈ，ｍ），３．８６－３．９７（４Ｈ，ｍ），４．７０－４．７７（１Ｈ，ｍ），５．１３（２Ｈ，ｓ），５．４３（１Ｈ，ｂｒｓ），６．４２（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．０Ｈｚ），６．６４－６．７１（１Ｈ，ｍ），７．１１－７．１５（２Ｈ，ｍ），７．２０－７．３１（４Ｈ，ｍ），７．３１－７．３８（４Ｈ，ｍ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：４７０（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0309] 工程２：Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｄ－フェニルアラニン

工程１で得た化合物（４．２１ｇ，８．９７ｍｍｏＬ）を酢酸エチル（２０ｍＬ）に溶解し、４規定塩酸の酢酸エチル溶液（２０．０ｍＬ）を加え、室温で一晩放置した。溶媒を減圧下で留去した後、トルエンを加え、溶媒を減圧下で留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ

）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（１．６６ｇ，４５％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）δ：２．９２－３．０１（１Ｈ，ｍ），３．１０－３．１８（１Ｈ，ｍ），３．６５－３．８１（３Ｈ，ｍ），３．８８－３．９８（１Ｈ，ｍ），４．６４－４．７３（１Ｈ，ｍ），５．０６（２Ｈ，ｓ），５．８７（１Ｈ，ｂｒｓ），７．１０－７．３７（１３Ｈ，ｍ）．ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：４１２（Ｍ＋Ｈ）$^-$

[0310] 工程３：Ｎ－［（ベンジルオキシ）カルボニル］グリシルグリシル－Ｄ－フェニルアラニル－Ｎ－｛［２－（ベンジルオキシ）－２－オキソエトキシ］メチル｝グリシンアミド

実施例３２工程１で得た化合物（１．２５ｇ，２．６３ｍｍｏＬ）のジオキサン（２５．０ｍＬ）溶液に、ピペリジン（５．００ｍＬ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５．００ｍＬ）を加えて室温で３０分間攪拌した。溶媒を減圧下で留去し、得られた残留物をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（２０．０ｍＬ）に溶解した。上記工程２の化合物（１．２０ｇ，２．９０ｍｍｏＬ）、及び１６．４％含水の４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド（１．０３ｇ，３．１６ｍｍｏＬ）を加え、室温で２時間攪拌した。反応液にクロロホルムを加え、水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール＝９：１（ｖ／ｖ）］にて精製し、標記化合物（２７０ｍｇ，１６％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．６，１０．０Ｈｚ），３．０５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．２Ｈｚ），３．５６－３．７９（６Ｈ，ｍ），４．１５（２Ｈ，ｓ），４．４７－４．５４（１Ｈ，ｍ），４．６３（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．７Ｈｚ），５．０３（２Ｈ，ｓ），５．１５（２Ｈ，ｓ），７．１４－７．３９（１５Ｈ，ｍ），７．５０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．０２（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ

），８．１６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ），８．３４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），８．６０（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６４８（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0311] 工程４：グリシルグリシル－Ｄ－フェニルアラニル－Ｎ－［（カルボキシメトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程３で得た化合物（２００ｍｇ，０．３１ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（５．０ｍＬ）に溶解し、５％パラジウム炭素触媒（０．１２ｇ）を加え、水素雰囲気下、室温で９時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、残留物を水とＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドの混合溶媒で洗浄した。ろ液と洗液を合わせて減圧下で留去し、標記化合物（０．１５ｇ，定量的）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$）δ：２．８５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．３，９．７Ｈｚ），３．０８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，５．４Ｈｚ），３．４３－３．５２（４Ｈ，ｍ），３．６２－３．８９（７Ｈ，ｍ），４．３６－４．４４（１Ｈ，ｍ），４．５８－４．６７（２Ｈ，ｍ），７．１２－７．２９（５Ｈ，ｍ），８．４４（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．６７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），８．７８（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），８．９１（１Ｈ，ｂｒｓ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：４２４（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

[0312] 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－Ｄ－フェニルアラニル－Ｎ－［（カルボキシメトキシ）メチル］グリシンアミド

上記工程４で得た化合物（０．１５ｇ，０．３５ｍｍｏＬ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）に溶解し、６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル（０．１１ｇ，０．３５ｍｍｏＬ）を加え、室温で１時間攪拌した。反応液にクロロホルムを加え、水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール

：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（４１ｍｇ，２６％）を無色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：１．１３－１．２４（２Ｈ，ｍ），１．４２－１．５３（４Ｈ，ｍ），２．１２（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），２．８２（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，１０．０Ｈｚ），３．０９（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．９，４．８Ｈｚ），３．１７（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝４．２Ｈｚ），３．４７－３．８９（８Ｈ，ｍ），４．０８－４．１４（１Ｈ，ｍ），４．４１－４．４９（１Ｈ，ｍ），４．５８－４．６９（２Ｈ，ｍ），７．００（２Ｈ，ｓ），７．１４－７．２７（５Ｈ，ｍ），８．３１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），８．３９（１Ｈ，ｂｒｓ），８．５５（２Ｈ，ｂｒｓ），８．９３（１Ｈ，ｂｒｓ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：６１５（Ｍ－Ｈ）$^-$

[0313] 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］グリシルグリシル－Ｄ－フェニルアラニル－Ｎ－［（２－｛［（１Ｓ，９Ｓ）－９－エチル－５－フルオロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１０，１３－ジオキソ－２，３，９，１０，１３，１５－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１－イル］アミノ｝－２－オキソエトキシ）メチル］グリシンアミド

エキサテカンのメタンスルホン酸塩（２２ｍｇ，０．３８８ｍｍｏＬ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）溶液に、トリエチルアミン（５．４２μＬ、０．３８８ｍｍｏＬ）、上記工程５で得た化合物（２９ｍｇ，０．４６６ｍｍｏＬ）、及び１６．４％含水の４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド（１９ｍｇ，０．６８６ｍｍｏＬ）を０℃で加え、室温で１時間攪拌した。反応液を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー［クロロホルム～クロロホルム：メタノール：水＝７：３：１（ｖ／ｖ／ｖ）の分配有機層］にて精製し、標記化合物（２６ｍｇ，６５％）

を薄黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）δ：０．８７（３Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ），１．１２－１．２２（２Ｈ，ｍ），１．４０－１．５１（４Ｈ，ｍ），１．７９－１．９２（２Ｈ，ｍ），２．０９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ），２．１３－２．２３（２Ｈ，ｍ），２．３９（３Ｈ，ｓ），２．７８（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝１３．６，９．４Ｈｚ），２．９８－３．０５（１Ｈ，ｍ），３．１３－３．２３（２Ｈ，ｍ），３．５４－３．７８（８Ｈ，ｍ），４．０２（２Ｈ，ｓ），４．４１－４．５０（１Ｈ，ｍ），４．６１－４．６６（２Ｈ，ｍ），５．２１（２Ｈ，ｓ），５．４２（２Ｈ，ｓ），５．５６－５．６４（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），６．９９（２Ｈ，ｓ），７．１４－７．２７（５Ｈ，ｍ），７．３１（１Ｈ，ｓ），７．７９（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．４Ｈｚ），８．０７（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．１４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ），８．３１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．７Ｈｚ），８．５３（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝９．１Ｈｚ），８．６３（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ）．

ＭＳ（ＡＰＣＩ）ｍ／ｚ：１０３４（Ｍ＋Ｈ）$^+$

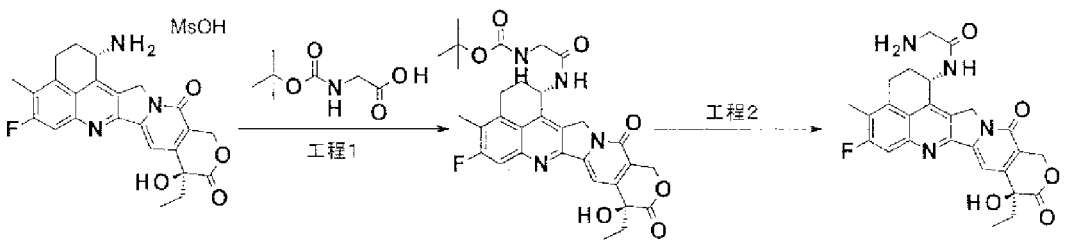
[0314] 工程７：抗体－薬物コンジュゲート（４４）

参考例１にて作製したトラスツズマブ及び上記工程６で得た化合物を用いて、実施例７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：１６．８ｍｇ（８４％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．１。

[0315] 実施例４５　中間体（４５）

[化71]



[0316] 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、室温で１時間撹拌した。この溶液を、エキサテカン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、室温で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）$^{+}$

[0317] 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

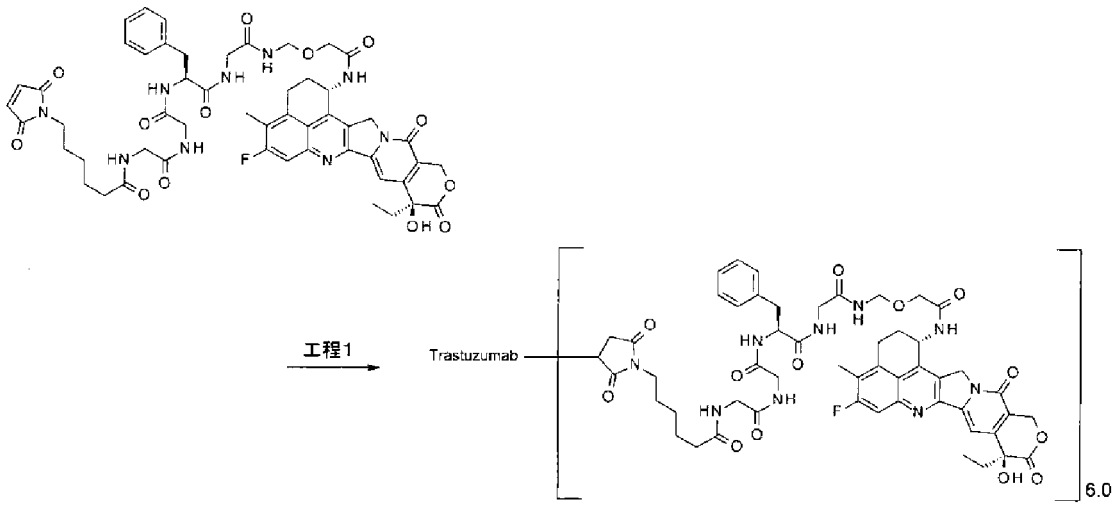
上記工程１で得た化合物（０．５１３ｇ，１．０１ｍｍｏＬ）を、実施例１工程２と同様に反応させ、標記化合物（０．４６３ｇ，９３％）を黄色固体として得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）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）$^{+}$

[0318] 実施例４６　抗体－薬物コンジュゲート（４６）

[化72]



[0319] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４６）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（５０ｍＬ）をポリカーボネート製の１２５ｍＬ三角フラスコ容器に入れ、マグネティックスターラー撹拌下、室温で１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（０．７５０ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（１．８５７ｍＬ；抗体一分子に対して５．４当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、撹拌を停止し、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した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、撹拌下、実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（２．９５８ｍＬ；抗体一分子に対して８．６当量）をゆっくり滴下して加えた。１５℃で、最初の３０分間は撹拌し、次の１時間は撹拌を停止させてインキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（０．４４４ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温で２０分間撹拌し、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。

精製：撹拌下、上記溶液に２０％酢酸水（約０．２５ｍＬ）とＡＢＳ（５０ｍＬ）をゆっくり加え、本溶液のｐＨを５．５±０．１にした。この溶液を精密ろ過（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＨＶフィルター、０．４５μｍ、ＰＶＤＦ膜）して白濁物を除いた。この溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｂｉｏｍａｘ　５０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳを滴下しながら（計８００ｍＬ）、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに

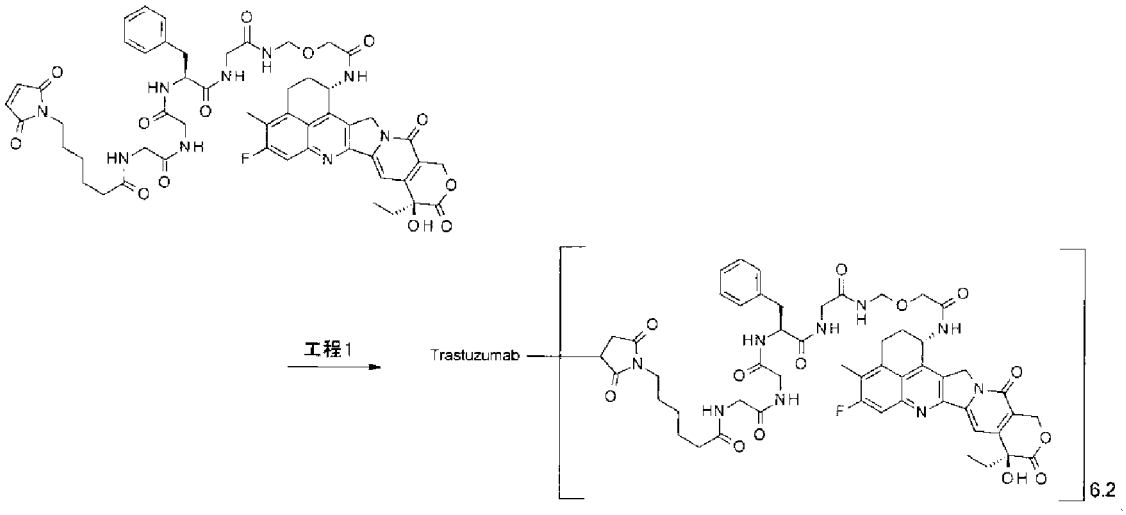
濃縮まで行った。得られた精製溶液に対して、精密ろ過（０．２２μｍ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶフィルター、ＰＶＤＦ膜）及び０．１０μｍ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏ．　Ｍｉｌｌｅｘ－ＶＶフィルター、ＰＶＤＦ膜））を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を４２．５mL得た。

特性評価：共通操作Ｅ及びＦ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８（実測値）、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７（実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：１０．４ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：４４２ｍｇ（８８．５％），共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．０；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．５。

[0320] 実施例４７　抗体－薬物コンジュゲート（４７）

[化73]



[0321] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４７）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（１５ｍＬ）をポリプロピレン製チューブに入れ、ここに１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（０．５６７ｍＬ；抗体一分子に対して５．５当量）及び１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（０．２２５ｍＬ）を加えた。本

溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に、３７℃で２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、ＤＭＳＯ（０．１４６ｍＬ）と実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（０．９２８ｍＬ；抗体一分子に対して９．０当量）を室温で加え、１５℃で３０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水溶液（０．１３３ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温で２０分間攪拌し、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。

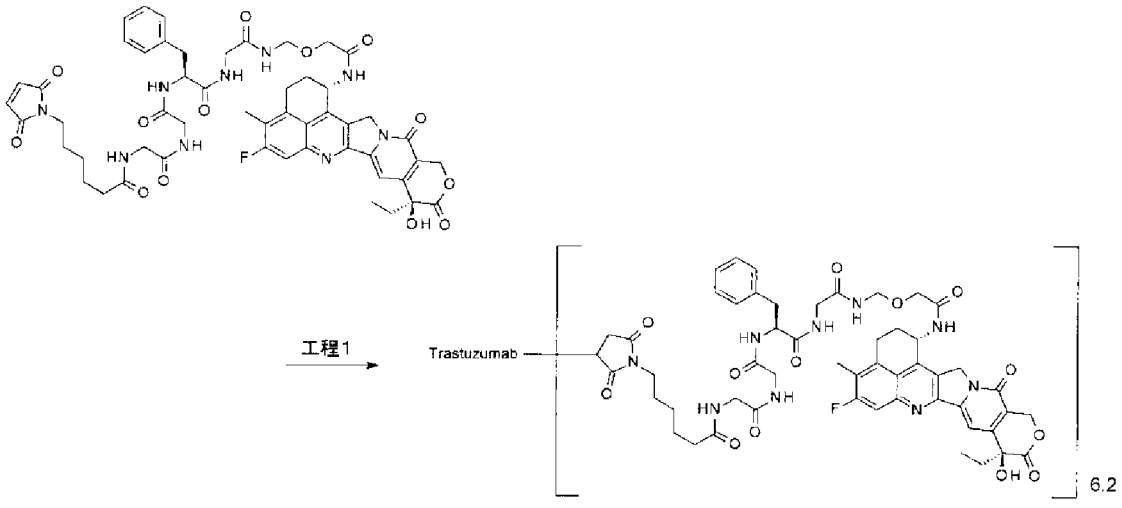
精製：上記溶液を、共通操作Ｄ（緩衝液としてＡＢＳを使用）を用いた精製を行い、目的の化合物を含有する溶液を４９ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２．９１ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：１４３ｍｇ（９５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２

[0322] 実施例４８　抗体－薬物コンジュゲート（４８）

[化74]



[0323] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４８）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及

びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（２８０ｍＬ）をポリカーボネート製の１０００ｍＬ三角フラスコ容器に入れ、マグネティックスターラー撹拌下、室温で１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（４．２００ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（１０．５９４ｍＬ；抗体一分子に対して５．５当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に撹拌を停止し、３７℃で２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した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、撹拌下、実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（１７．３３５ｍＬ；抗体一分子に対して９．０当量）をゆっくり滴下して加えた。１５℃で、３０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（２．４８５ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温で２０分間撹拌し、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。

精製：撹拌下、上記溶液に２０％酢酸水（約１．４ｍＬ）とＡＢＳ（２８０ｍＬ）をゆっくり加え、本溶液のｐＨを５．５±０．１とした。この溶液を精密ろ過（０．４５μｍ、ＰＶＤＦ膜）して白濁物を除き、ろ液を約６００mL得た。この溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｂｉｏｍａｘ　５０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳ（計４８００ｍＬ）を滴下しながら、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行った。得られた精製溶液に対

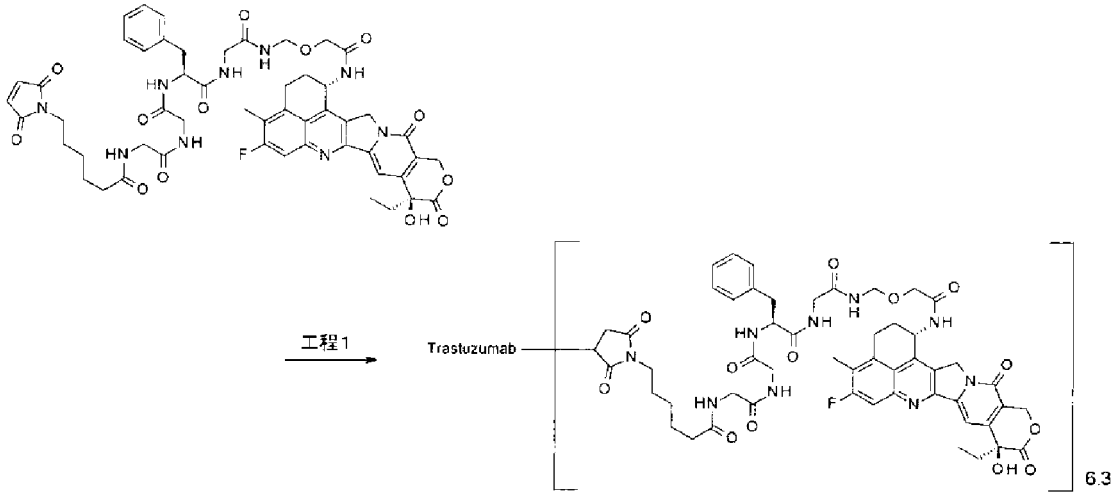
して、精密ろ過（０．２２μｍ及び０．１０μｍの２回、ＰＶＤＦ膜）を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を７０ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：３５．９６ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２５１７ｍｇ（９０％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．２

[0324] 実施例４９　抗体－薬物コンジュゲート（４９）

[化75]



[0325] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（４９）

抗体の還元：参考例１にて作製したトラスツズマブを、共通操作Ｃ－１及びＢ（２８０ｎｍ吸光係数として１．４８ｍＬｍｇ$^{-1}$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（２８０ｍＬ）をポリカーボネート製の１０００ｍＬ三角フラスコ容器に入れ、マグネティックスターラー撹拌下、室温で１Ｍリン酸水素二カリウム水溶液（４．２００ｍＬ）を加えた後、１０ｍＭ　ＴＣＥＰ水溶液（１０．５９４ｍＬ；抗体一分子に対して５．５当量）を加えた。本溶液のｐＨが７．０±０．１内であることを確認した後に撹拌を停止し、３７℃で２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した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を１５℃に冷却後、

撹拌下、実施例２６工程８の化合物を１０ｍＭ含むＤＭＳＯ溶液（１７．３３５ｍＬ；抗体一分子に対して９．０当量）をゆっくり滴下して加えた。１５℃で、３０分間撹拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、撹拌下、１００ｍＭ　ＮＡＣ水溶液（２．４８５ｍＬ；抗体一分子に対して１２．９当量）を加え、さらに室温で２０分間撹拌し、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。

精製：撹拌下、上記溶液に２０％酢酸水（約１．４ｍＬ）とＡＢＳ（２８０ｍＬ）をゆっくり加え、本溶液のｐＨを５．５±０．１とした。この溶液を精密ろ過（０．４５μｍ、ＰＶＤＦ膜）して白濁物を除き、ろ液を約６００mL得た。この溶液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　ＸＬ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ、Ｕｌｔｒａｃｅｌｌ　３０ＫＤａ）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ　ｍｏｄｅｌ　７７５２１－４０、ポンプヘッド　ｍｏｄｅｌ　７５１８－００）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ　Ｌ／Ｓ１６）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてＡＢＳ（計４８００ｍＬ）を滴下しながら、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子量試薬を除去するとともに緩衝液をＡＢＳへ置換し、さらに濃縮まで行った。得られた精製溶液に対して、精密ろ過（０．２２μｍ及び０．１０μｍの２回、ＰＶＤＦ膜）を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を１３０mL得た。

特性評価：共通操作Ｅ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２１．００ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：２７３０ｍｇ（９７．５％），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．３

[0326] 実施例５０　抗体－薬物コンジュゲート（５０）

[0327] 工程１：抗体－薬物コンジュゲート（５０）

実施例４７、４８及び４９で作製した抗体－薬物コンジュゲート（４７）、（４８）及び（４９）を混合し（２４３ｍＬ）、さらにＡＢＳ（３９．７

５ｍＬ）を加えることで、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を２８３ｍＬ得た。

特性評価：共通操作Ｅ及びＦ（$\varepsilon_{D,280}$＝５１７８、$\varepsilon_{D,370}$＝２０２１７を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：２０．０ｍｇ／ｍＬ，抗体収量：５６５５ｍｇ，共通操作Ｅにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：６．３；共通操作Ｆにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（ｎ）：７．８。

[0328] 評価例１　抗体－薬物コンジュゲートの抗細胞効果（１）

ＨＥＲ２抗原陽性細胞のヒト乳癌株であるＫＰＬ－４（川崎医科大学・紅林淳一先生，British Journal of Cancer, (1999)79(5/6). 707-717）、抗原陰性細胞のＭＣＦ７（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ；ＥＣＡＣＣ）は１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＲＰＭＩ１６４０（ＧＩＢＣＯ；以下、培地）で培養した。ＫＰＬ－４、ＭＣＦ７を培地で２．５×10^4 Ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるようにそれぞれ調製し、９６穴細胞培養用マイクロプレートに１００μＬ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に希釈したトラスツズマブ又は抗体－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。抗体非添加ウェルには培地を１０μＬずつ添加した。３７℃、５％CO_2下で５乃至７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て室温で３０分間静置した。培養液と等量のＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加して撹拌した。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：サンプルａの濃度

ｂ：サンプルｂの濃度

ｃ：サンプルａの生細胞率

ｄ：サンプルｂの生細胞率

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：サンプルウェルの発光量の平均値（ｎ＝２）

ｂ：抗体非添加ウェルの発光量の平均値（ｎ＝１０）

[0329] 抗体－薬物コンジュゲート（２）、（３）、（５）、（７）、（１０）、（１２）、（１３）、（１６）、（１８）、（４０）、（４２）は、ＫＰＬ－４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（４）、（６）、（９）、（１５）、（１７）、（２１）、（２２）、（２５）、（３６）、（３７）、（３９）、（４１）、（４３）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（２０）、（２４）、（２７）は、１＜IC_{50}＜１００（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。抗体－薬物コンジュゲート（１９）、（２６）は抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

一方、ＭＣＦ７細胞に対しては（５）、（１３）、（４３）が１＜IC_{50}＜１００（ｎＭ）の抗細胞効果を示したが、抗体－薬物コンジュゲート（２）、（３）、（４）、（６）、（７）、（９）、（１０）、（１２）、（１５）、（１６）、（１７）、（１８）、（２５）、（２６）、（２７）、（３９）、（４０）、（４１）、（４２）、（４４）は抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

また、トラスツズマブはＫＰＬ－４細胞、ＭＣＦ７細胞ともに抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0330] 評価例２　抗腫瘍試験（１）

マウス：５－６週齢の雌ヌードマウス（日本チャールス・リバー株式会社）を実験使用前にＳＰＦ条件下で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－１５ＣＸ，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}

[0331] 抗体－薬物コンジュゲート及び抗体は全て生理食塩水（株式会社大塚製薬工場）で希釈し、１０ｍＬ／ｋｇの液量を尾静脈内投与した。

ＫＰＬ－４細胞を生理食塩水に懸濁し、１．５×１０^{7}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１５に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（２７）又は対照群として抗ＨＥＲ２抗体トラスツズマブ（参考例１）をＤａｙ１５、２２に全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として無処置群を設定した。

[0332] 結果を図３に示す。トラスツズマブの投与により腫瘍の増殖が抑制されたが、抗体－薬物コンジュゲート（２７）の投与では腫瘍増殖抑制効果はより顕著であった。なお、図中、横軸は細胞移植後の日数、縦軸は腫瘍体積を示す。また、トラスツズマブ又は抗体－薬物コンジュゲート（２７）を投与されたマウスでは、体重減少等の特に目立った所見も無く、抗体－薬物コンジュゲート（２７）は高い安全性を有していると考えられる。なお、以下の抗腫瘍試験に関する評価例において、特に記載のない場合、本評価例で使用した手法で試験が実施されている。

[0333] 評価例３　抗腫瘍試験（２）

ＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から購入したヒト胃癌株ＮＣＩ－Ｎ８７細胞を、生理食塩水に懸濁し１×１０^{7}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ７に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（

８）、（２８）、又はトラスツズマブエムタンシン（参考例２）をＤａｙ７に全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として無処置群を設定した。

[0334] 結果を図４に示す。抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２８）は、トラスツズマブエムタンシンと同等の腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。また、抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２８）、又はトラスツズマブエムタンシン投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0335] 評価例４　抗腫瘍試験（３）

ＤＳＭＺ（Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ)から購入したヒト乳癌株ＪＩＭＴ－１細胞を生理食塩水に懸濁して３×１０^{6}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ１２に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２９）、（３０）、又はトラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシンをＤａｙ１２、１９に全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として生理食塩水投与群を設定した。

[0336] 結果を図５に示す。ＪＩＭＴ－１腫瘍に対し、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシンの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。一方、抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２９）、（３０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。また、抗体－薬物コンジュゲート（８）、（２９）、（３０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシン投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0337] 評価例５　抗体－薬物コンジュゲートの抗細胞効果（２）

ヒト非小細胞肺癌株Ｃａｌｕ－３（ＡＴＣＣ）は、１０％のウシ胎児血清（ＭＯＲＥＧＡＴＥ）を含むＥａｇｌｅ’ｓ Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＧＩＢＣＯ；以下、ＭＥＭ培地）で培養した。

ヒト胃癌株ＮＣＩ－Ｎ８７（ＡＴＣＣ）、ヒト胃癌株ＭＫＮ－４５（ヒューマンサイエンス研究資源バンク）は、１０％のウシ胎児血清を含むＲＰＭ

１１６４０　Ｍｅｄｉｕｍ（ＧＩＢＣＯ；以下、ＲＰＭＩ培地）で培養した。

ヒト乳癌株ＭＤＡ－ＭＢ－４５３（ＡＴＣＣ）、ヒト乳癌株ＭＤＡ－ＭＢ－４６８（ＡＴＣＣ）は、１０％のウシ胎児血清を含むＬｅｉｂｏｖｉｔｚ’ｓ　Ｌ－１５　Ｍｅｄｉｕｍ（ＧＩＢＣＯ；以下、Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ’ｓ培地）で培養した。

この５種類の細胞株のうち、Ｃａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｎ８７、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３はＨＥＲ２陽性細胞、ＭＫＮ－４５及びＭＤＡ－ＭＢ－４６８はＨＥＲ２陰性細胞である。

Ｃａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｎ８７、ＭＫＮ－４５を、ＭＥＭ培地又はＲＰＭＩ培地で4×10^4ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、６５μＬの培地を入れた９６穴細胞培養用マイクロプレートに２５μＬずつ添加して、３７℃、５％　CO_2下で一晩培養した。また、ＭＤＡ－ＭＢ－４５３、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８を、Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ’ｓ培地で4×10^4ｃｅｌｌｓ／ｍＬになるように調製し、６５μＬの培地を入れた９６穴細胞培養用マイクロプレートに２５μＬずつ添加して、３７℃、CO_2濃度設定なし下で一晩培養した。

翌日、ＲＰＭＩ培地又はＬｅｉｂｏｖｉｔｚ’ｓ培地で１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、０．３２ｎＭ、０．０６４ｎＭに希釈した検体、さらにＲＰＭＩ培地又はＬｅｉｂｏｖｉｔｚ’ｓ培地を上記マイクロプレートに１０μＬずつ添加し、３７℃、５％　CO_2又は３７℃、CO_2濃度設定なし下で６日間培養した。

Ｃａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｎ８７、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８には抗体－薬物コンジュゲート（４６）を、その他の細胞には抗体－薬物コンジュゲート（５０）を検体として添加した。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て室温で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、プレートミキサーで攪拌して細胞を

完全に溶解した。室温で１０分間静置後にプレートリーダーで発光量を計測した。

生細胞率は次式で算出した。

生細胞率（％）＝ａ÷ｂ×１００

ａ：検体添加ウェルの発光量の平均値

ｂ：培地添加ウェルの発光量の平均値

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：検体濃度ａ

ｂ：検体濃度ｂ

ｃ：検体濃度ａにおける生細胞率

ｄ：検体濃度ｂにおける生細胞率

ａ、ｂは生細胞率５０％を挟む２点でａ＞ｂ。

[0338] 抗体－薬物コンジュゲート（４６）は、ＨＥＲ２陽性細胞Ｃａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｎ８７に対してIC_{50}＜１（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。一方、ＨＥＲ２陰性細胞ＭＤＡ－ＭＢ－４６８に対しては抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0339] 抗体－薬物コンジュゲート（５０）は、ＨＥＲ２陽性細胞ＭＤＡ－ＭＢ－４５３に対してIC_{50}＜１（ｎＭ）の抗細胞効果を示した。一方、ＨＥＲ２陰性細胞ＭＫＮ－４５に対しては抗細胞効果を示さなかった（＞１００（ｎＭ））。

[0340] 評価例６　抗腫瘍試験（４）

ＨＥＲ２低発現であるヒト膵臓癌株Ｃａｐａｎ－１細胞（ＡＴＣＣ）を生理食塩水に懸濁して４×10^7ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植してＣａｐａｎ－１固形腫瘍を作成した。その後、この固形腫瘍を雌ヌードマウス移植により複数回継代維持して本試験に用いた。固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ２０に無

作為に群分けを実施した。

抗体－薬物コンジュゲート（３１）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをＤａｙ２０に全て１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として生理食塩水投与群を設定した。

結果を図６に示す。Ｃａｐａｎ－１腫瘍に対し、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシンの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗体－薬物コンジュゲート（３１）の投与によって腫瘍の増殖は顕著に抑制され、ＨＥＲ２低発現腫瘍であっても抗体－薬物コンジュゲート（３１）の有効性が確認された。ＨＥＲ２非発現胃癌株ＧＣＩＹ腫瘍に対しては抗体－薬物コンジュゲート（３１）は腫瘍増殖抑制を示さなかった。

なお、腫瘍におけるＨＥＲ２の発現に関し、ＨＥＲ２検査ガイド第三版（日本病理学会、トラスツズマブ病理部会作成）に記載された免疫組織化学染色による測定結果に基づき、スコアが３＋であるものを高発現とし、２＋を中発現、１＋を低発現と各々分類した。また、当該測定法においてスコアが０であっても、例えばフローサイトメーターによる測定法等の他の測定法によって陽性である場合は低発現に分類した。

[0341] 評価例７　抗腫瘍試験（５）

ＡＴＣＣから購入したヒト胃癌株ＮＣＩ－Ｎ８７細胞を、生理食塩水に懸濁して１×１０^{7}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し（Ｄａｙ０）、Ｄａｙ６に無作為に群分けを実施した。抗体－薬物コンジュゲート（５０）をＤａｙ６に各群０．３、１、３、１０ｍｇ／ｋｇの用量でそれぞれ尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図７に示す。抗体－薬物コンジュゲート（５０）は、投与量に依存した抗腫瘍効果を示した。また、抗体－薬物コンジュゲート（５０）投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0342] 評価例８　抗腫瘍試験（６）

本試験は以下の方法で実施された。

マウス：６－１２週齢の雌ヌードマウス（チャールス・リバー社）を実験

に供した。

測定、計算式：腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパーで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）＝０．５２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

抗体－薬物コンジュゲート、トラスツズマブ、及びトラスツズマブエムタンシンは酢酸緩衝液で希釈し、１０ｍＬ／ｋｇの液量を尾静脈内投与した。

[0343] 乳癌患者から摘出した腫瘍を雌ヌードマウスに移植することにより複数回継代維持した腫瘍（ＳＴ２２５；Ｓｏｕｔｈ Ｔｅｘａｓ Ａｃｃｅｌｅｒａｔｅｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（ＳＴＡＲＴ）社）を本試験に用いた。この腫瘍はＨＥＲ２中発現（免疫組織化学染色による判定は２＋）である。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの体側部に皮下移植し、腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図８に示す。ＨＥＲ２中発現である乳癌ＳＴ２２５腫瘍に対し、トラスツズマブの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、トラスツズマエムタンシン又は抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。

[0344] 評価例９　抗腫瘍試験（７）

乳癌患者から摘出した腫瘍を雌ヌードマウスに移植することにより複数回継代維持した腫瘍（ＳＴ９１０；ＳＴＡＲＴ社）を本試験に用いた。この腫瘍はＨＥＲ２低発現（免疫組織化学染色による判定は１＋）である。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの体側部に皮下移植し、腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズ

マブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図９に示す。ＨＥＲ２低発現である乳癌ＳＴ９１０腫瘍に対し、トラスツズマブ及びトラスツズマエムタンシンの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制され、ＨＥＲ２低発現乳癌腫瘍に対する抗体－薬物コンジュゲート（５０）の有効性が確認された。なお、この評価例９は評価例８と同一の手法で実施されている。

[0345] 評価例１０　抗腫瘍試験（８）

本試験は以下の方法で実施された。さらに、評価例１１～１３も本手法によって実施されている。

マウス：５－８週齢の雌ヌードマウス（Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）を実験に供した。

測定、計算式：腫瘍の長径および短径を電子式デジタルキャリパーで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）＝０．５２×長径（ｍｍ）×［短径（ｍｍ）］^{2}

抗体－薬物コンジュゲート、トラスツズマブ、及びトラスツズマブエムタンシンは酢酸緩衝液で希釈し、１０ｍＬ／ｋｇの液量を尾静脈内投与した。

[0346] 大腸癌患者から摘出した腫瘍を雌ヌードマウスに移植することにより複数回継代維持した腫瘍（ＣＴＧ－０４０１；ＣＨＡＭＰＩＯＮＳ　ＯＮＣＯＬＯＧＹ社）を本試験に用いた。この腫瘍はＨＥＲ２低中発現（免疫組織化学染色による判定は１＋又は２＋）である。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの左体側部に皮下移植し、腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図１０に示す。ＨＥＲ２低中発現大腸癌ＣＴＧ－０４０１腫瘍に対し、トラスツズマブ又はトラスツズマエムタンシンの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。

[0347] 評価例１１　抗腫瘍試験（９）

非小細胞肺癌患者から摘出した腫瘍を雌ヌードマウス移植により複数回継代維持した腫瘍（ＣＴＧ－０８６０；ＣＨＡＭＰＩＯＮＳ ＯＮＣＯＬＯＧＹ社）を本試験に用いた。この腫瘍はＨＥＲ２中発現（免疫組織化学染色による判定は２＋）である。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの左体側部に皮下移植し、腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図１１に示す。ＨＥＲ２中発現非小細胞肺癌ＣＴＧ－０８６０腫瘍に対し、トラスツズマブ又はトラスツズマエムタンシンの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。

[0348] 評価例１２　抗腫瘍試験（１０）

胆管癌患者から摘出した腫瘍を雌ヌードマウスに移植することにより複数回継代維持した腫瘍（ＣＴＧ－０９２７；ＣＨＡＭＰＩＯＮＳ ＯＮＣＯＬＯＧＹ社）を本試験に用いた。この腫瘍はＨＥＲ２高発現（免疫組織化学染色による判定は３＋）である。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの左体側部に皮下移植し、腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図１２に示す。ＨＥＲ２高発現胆管癌ＣＴＧ－０９２７腫瘍に対し、トラスツズマブの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、トラスツズマブエムタンシンの投与により腫瘍の増殖は抑制された。さらに抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与は腫瘍の退縮を誘導した。

[0349] 評価例１３　抗腫瘍試験（１１）

食道癌患者から摘出した腫瘍を雌ヌードマウスに移植することにより複数回継代維持した腫瘍（ＣＴＧ－０１３７；ＣＨＡＭＰＩＯＮＳ ＯＮＣＯＬＯＧＹ社）を本試験に用いた。この腫瘍はＨＥＲ２高発現（免疫組織化学染色による判定は３＋）である。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの左体側部に皮下移植し、腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈内投与した。コントロール群として酢酸緩衝液投与群を設定した。

結果を図１３に示す。ＨＥＲ２高発現食道癌ＣＴＧ－０１３７腫瘍に対し、トラスツズマブの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、トラスツズマブエムタンシン又は抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。

[0350] 評価例１４　抗腫瘍試験（１２）

ＡＴＣＣから購入した、ＨＥＲ２高発現であるヒト卵巣癌株ＳＫ－ＯＶ－３細胞を生理食塩水に懸濁して４×１０^{7}ｃｅｌｌｓを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し、ＳＫ－ＯＶ－３固形腫瘍を作成した。その後、この固形腫瘍を雌ヌードマウスに移植することにより複数回継代維持して本試験に用いた。

固形腫瘍の腫瘍片を雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植して腫瘍体積が１００－３００ｍｍ^{3}に到達した時点で無作為に群分けを実施した。群分け日をＤａｙ０とし、Ｄａｙ０に抗体－薬物コンジュゲート（５０）、トラスツズマブ、又はトラスツズマブエムタンシンをいずれも１０ｍｇ／ｋｇの用量

で尾静脈内投与した。コントロール群として生理食塩水投与群を設定した。

結果を図１４に示す。ＳＫ－ＯＶ－３腫瘍に対し、トラスツズマブの投与は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、トラスツズマブエムタンシン又は抗体－薬物コンジュゲート（５０）の投与により腫瘍の増殖は顕著に抑制された。

配列表フリーテキスト

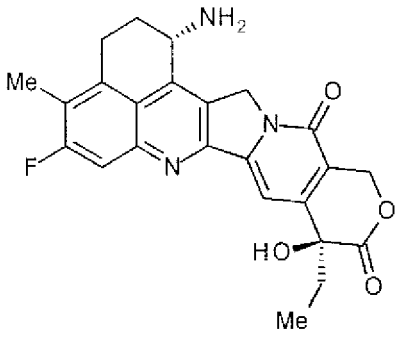
[0351] 配列番号１：ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号２：ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体軽鎖のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 次式

[化1]



で示される抗腫瘍性化合物と抗ＨＥＲ２抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

で示される構造のリンカーを介して、抗ＨＥＲ２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によっ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ＨＥＲ２抗体は、L^1の末端において結合する。

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、$-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基に結合する。

式中、n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^1は、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$を示し、

ここで、n^3は、２から８の整数を示し、

L^2は、$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$又は単結合を示し、

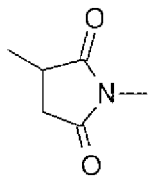
ここで、n^4は、１から６の整数を示し

L^Pは、２から７個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^aは、-O-又は単結合を示し、

$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

[化2]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。）

[請求項2] L^Pのペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である請求項１記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項3] L^Pが、以下の群から選ばれるペプチド残基である請求項１又は２に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

-GGF-

-DGGF-

-(D-)D-GGF-

-EGGF-

-GGFG-

-SGGF-

-KGGF-

-DGGFG-

-GGFGG-

-DDGGFG-

-KDGGFG-

-GGFGGGF-

（ここで『(D-)D』はD-アスパラギン酸を示す。）

[請求項4] L^Pが、４個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である請求項１又

は２に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項5] L^Pが、テトラペプチド残基の-GGFG-である請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項6] n^3が２から５の整数であって、L^2が単結合である請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項7] n^3が２から５の整数であって、L^2が$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$であり、$n^4$が２又は４である請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項8] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、４から７原子の鎖長を有する部分構造である請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項9] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、５又は６原子の鎖長を有する部分構造である請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項10] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、以下のいずれかである請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

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

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

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

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

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

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

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

[請求項11] $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$が、以下のいずれかである請求項１０に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

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

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

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

[請求項12] $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$に薬物を結合させた薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

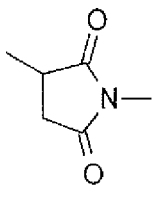
$-(Succinimid-3-yl-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$

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

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

（ここで、$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

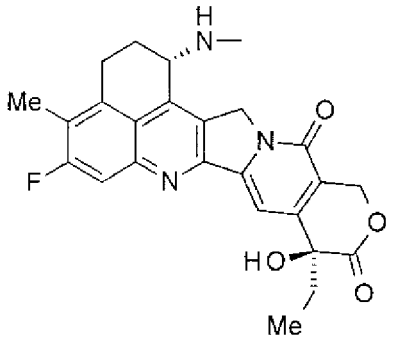
[化3]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２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。

-(NH-DX)は次式：

[化4]



で示される、１位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。）

[請求項13] 薬物－リンカー構造部分が、次の群から選ばれる１種の薬物－リンカー構造である請求項１２に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

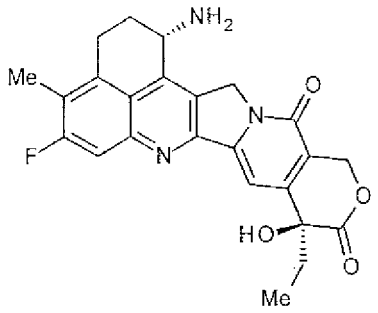
-(Succinimid-3-yl-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)

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

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

[請求項14] 次式

[化5]



で示される抗腫瘍性化合物と抗ＨＥＲ２抗体とを次式：

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

で示される構造のリンカーを介して、抗ＨＥＲ２抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して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ＨＥＲ２抗体はL^1の末端において結合する。

抗腫瘍性化合物は$-(CH_2)n^2-C(=O)-$部分のカルボニル基に結合する。

式中、n^1は、０から６の整数を示し、

n^2は、０から５の整数を示し、

L^1は、$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$を示し、

ここで、n^3は、２から８の整数を示し、

L^2は、$-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$又は単結合を示し、

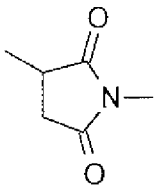
ここで、n^4は、１から６の整数を示し、

L^Pは、-GGFG-のテトラペプチド残基を示し、

L^aは、-O-又は単結合を示し、

$-(Succinimid-3-yl-N)-$は次式：

[化6]



で示される構造であり、このものの３位で抗ＨＥＲ２抗体と結合し、１位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。）

[請求項15] n^1が３であり、n^2が０であり、n^3が２であり、L^2が-NH-$(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)$-であって、$n^4$が２であり、$L^a$が単結合であるか、

n^1が１であり、n^2が１であり、n^3が５であり、L^2が単結合であり、L^aが-O-であるか、又は

n^1が２であり、n^2が１であり、n^3が５であり、L^2が単結合であり、L^aが-O-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^3が２又は５であって、L^2が単結合である請求項１４又は１５に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項17] n^3が２又は５であって、L^2が-NH-$(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)$-であり、$n^4$が２又は４である請求項１４又は１５に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項18] -NH-$(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)$-が、以下のいずれかである請求項１４～１７のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

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

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

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

[請求項19] 選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が１から１０個の範囲である請求項１～１８のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項20] 選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が２から８個の範囲である請求項１～１８のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項21] 選択された１種の薬物－リンカー構造の１抗体あたりの平均結合数が３から８個の範囲である請求項１～１８のいずれか一に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項22] 請求項１～２１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

[請求項23] 請求項１～２１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。

[請求項24] 肺癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌、乳癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜の癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、陰茎癌、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞種、骨髄腫、又は肉腫に適用するための請求項２３記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

[請求項25] 請求項１～２１のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

[請求項26] 肺癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌、乳癌、膀胱癌、胃癌、胃腸間質腫瘍、子宮頸癌、食道癌、扁平上皮癌、腹膜の癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、陰茎癌、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞種、骨髄腫、又は肉腫に適用するための請求項２５記載の医薬組成物。

[請求項27] 請求項１～２１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。