明　細　書

発明の名称 ：

抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と薬物とのコンジュゲート、およびその使用

技術分野

[0001]　本発明は、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と薬物とのコンジュゲートに関する。本発明はさらに、上記コンジュゲートを含む医薬に関する。

背景技術

[0002]　がんは、死亡原因の上位を占める重要な疾患であるが、その治療ニーズはいまだ満たされていない。近年、従来の化学療法の正常細胞にもダメージを与えるという問題点を解決するために、がん細胞に特異的に発現する特定の分子を標的として薬剤を設計し治療を行う分子標的薬によるがん治療が盛んに研究されている。

[0003]　その標的のひとつとして細胞膜表面抗原であるＣＤＨ３（Ｐ－カドヘリン）が同定された。ＣＤＨ３はカルシウム依存的に同種親和性の細胞接着に関与する分子として発見された膜タンパク質である。相互にホモロジーが高い約１１０アミノ酸残基からなるカドヘリンリピートを持つタンパク質はカドヘリンスーパーファミリーと呼ばれ、ＣＤＨ３はその主要メンバーに属する。

[0004]　ある種のがん細胞においてはＣＤＨ３の発現上昇例が報告されており、正常組織と比較してがん組織でのＣＤＨ３の発現が高いがん細胞に対して抗体を用いたがん治療が検討されている。

[0005]　抗体の抗がん作用を増強する有効な手段の一つとして、抗体と強力な毒性を有する物質（薬物）との連結があげられる。強力な毒性を有する物質はそれ単独で患者に投与すると正常組織にも傷害を及ぼし、有効な治療手段とはなり得ない。しかしながら、がん細胞特異的な抗原と結合する抗体と薬物を連結することにより、正常な組織に悪影響を及ぼさず、がん細胞のみ殺傷しえる能力を持つに至る。こうした薬剤は抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ、

Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｄｒｕｇ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）と呼ばれる。即ち、薬物は抗体と結合した状態では何ら毒性を示さない。しかし、ある種の抗体は標的とする抗原を発現する細胞に結合するとその細胞内に取り込まれ、リソソームにて分解される。したがって、薬物を結合したその種の抗体が細胞内に取り込まれた後、細胞内で分解される事で薬物が放出され、特定の細胞内部においてのみ毒性が発現し、その効果により細胞は殺傷される。

[0006] 特許文献１および特許文献２には、抗ＣＤＨ３（Ｐ－カドヘリン）抗体、およびその薬剤コンジュゲートが記載されている。特許文献３～６には、抗体－薬物コンジュゲートおよびその合成中間体が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０１３／１５０６２３号公報
特許文献2：国際公開ＷＯ２０１４／１２６１９８号公報
特許文献3：国際公開ＷＯ２０２３／１６３２２７号公報
特許文献4：国際公開ＷＯ２０２３／１６３２３４号公報
特許文献5：国際公開ＷＯ２０２３／２３４４２６号公報
特許文献6：国際公開ＷＯ２０２３／２３４４２７号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、新たな抗ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲートを提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ＣＤＨ３を特異的に認識する抗体から規定される相補性決定領域（ＣＤＲ）配列と、種々のヒト由来フレームワーク領域（ＦＲ）配列とを組み合わせることによって、そして親和性を改善するために適切なアミノ酸変異を導入することによって、免疫原性の少ない抗ＣＤＨ３ヒト化抗体を作出し、さらにこれを用いて

ＣＤＨ３を発現するがん細胞をより効率的に殺傷する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体薬剤コンジュゲートを作出することに成功し、本発明を完成するに至った。

本発明によれば、以下の発明が提供される。

[0010] ＜１＞　抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と、リンカーを有する化学療法剤とが、連結している抗体・薬物コンジュゲートであって、

前記抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が、

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

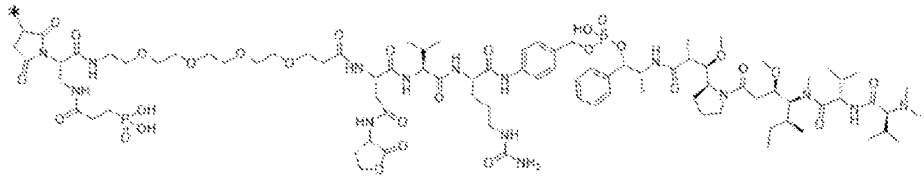
（３）ＣＤＨ３との結合能を有する、前記（１）又は（２）に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片；または

（４）ＣＤＨ３との結合能を有する、前記（１）又は（２）に記載した抗体の部分配列からなる抗体：

であり、

前記のリンカーを有する化学療法剤が、式（ｘ）：

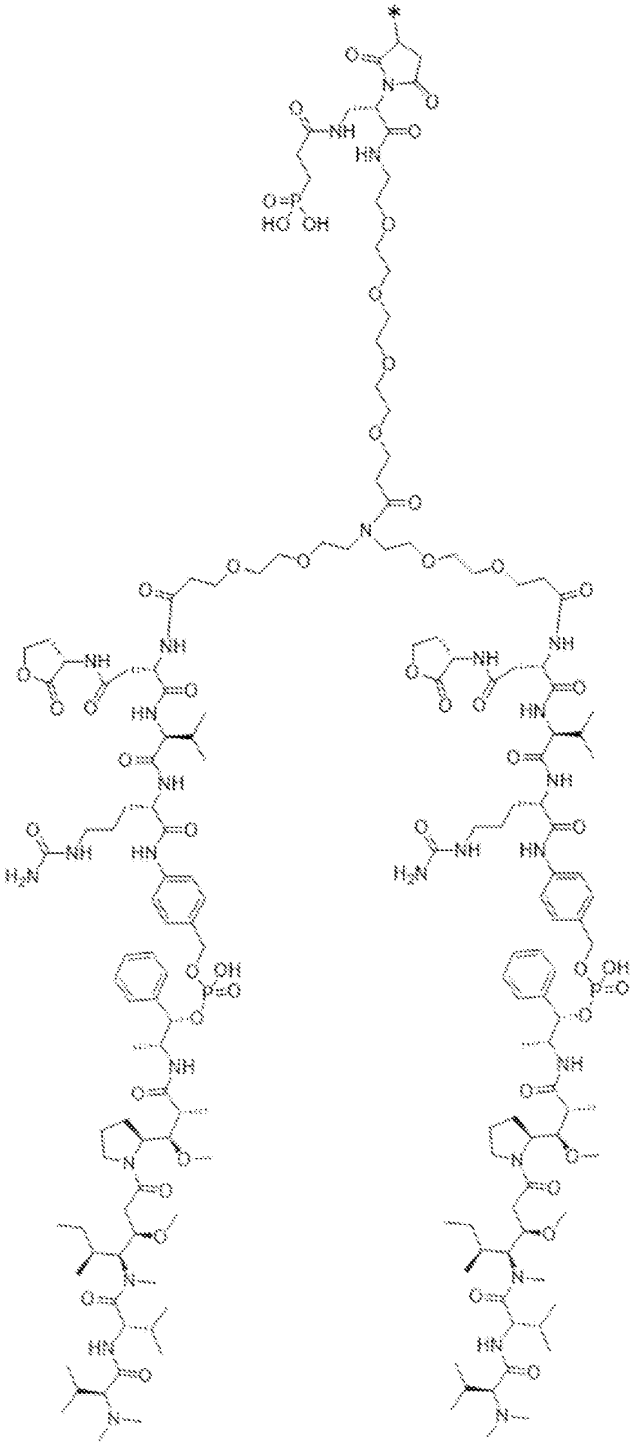
[化1]



（式中、＊が抗体との接続部分を示す。）

または式（ｙ）：

[化2]



（式中、＊が抗体との接続部分を示す。）

である抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物。

＜２＞　前記抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が、以下の何れかの抗体である、＜１＞に記載の抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物。

（１）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体

（２）配列番号７に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

＜３＞　１分子の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体に対して、平均で１～１０分子の、リンカーを有する化学療法剤が結合している、＜１＞に記載の抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物。

＜４＞　＜１＞から＜３＞の何れか一に記載の抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物を含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬。

＜５＞　ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患が、腫瘍またはがんである、＜４＞に記載の医薬。

[0011]　本発明によればさらに、上記した抗体薬物コンジュゲートを患者に投与することを含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療する方法が提供される。

本発明によればさらに、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬の製造のための、上記した抗体薬物コンジュゲートの使用が提供される。

本発明によればさらに、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患の治療において使用するための、上記した抗体薬物コンジュゲートが提供される。

発明の効果

[0012]　抗ＣＤＨ３ヒト化抗体は、その元となる抗体と比較して免疫原性の低減が

期待される。ヒト化抗体は、元となった抗体のＣＤＲ配列とヒト由来ＦＲ配列の適切な組み合わせにより構成される。もしこれが抗原との親和性を示さない時は、更に抗体可変領域へのアミノ酸変異を導入することで親和性回復の試みもなされる。ＣＤＲ配列と適切なＦＲ配列との組み合わせ、及び必要に応じたアミノ酸変異導入により、ＣＤＨ３と特異的に結合する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が得られる。このようにして得られた本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と化学療法剤とを連結して成る免疫複合体は、化学療法剤を結合しない抗体と比較して、ＣＤＨ３を発現するがん細胞に対して強力な細胞傷害活性を示す。

ＣＤＨ３を発現するがん細胞を有する患者に本発明による免疫複合体を投与することによって、高い抗がん作用を発揮できるとともに、それ自身の免疫原性の低減も達成できる。本発明の免疫複合体は、抗がん剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、ＡＤＣ１及びＡＤＣ３の細胞生存アッセイの生細胞の比率を示す。

[図2]図２は、ＡＤＣ１及びＡＤＣ２の細胞生存アッセイの生細胞の比率を示す。

[図3]図３は、ＡＤＣ３及びＡＤＣ４の細胞生存アッセイの生細胞の比率を示す。

[図4]図４は、ＡＤＣ３のｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験の結果を示す。

[図5]図５は、ＡＤＣ３のｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験時の体重結果を示す。

[図6]図６は、ＡＤＣ４のｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験の結果を示す。

[図7]図７は、ＡＤＣ４のｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験時の体重の結果を示す。

[図8]図８はＡＤＣ３、ＡＤＣ５及びＡＤＣ７のｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験の結果を示す。

[図9]図９はＡＤＣ３、ＡＤＣ５及びＡＤＣ７のｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験時の体重の結果を示す。

[図10]図１０はｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬物動態試験の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0014]　以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明は、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と、リンカーを有する化学療法剤とが、連結している抗体・薬物コンジュゲートであって、

前記抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が、

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（３）ＣＤＨ３との結合能を有する、前記（１）又は（２）に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片；または

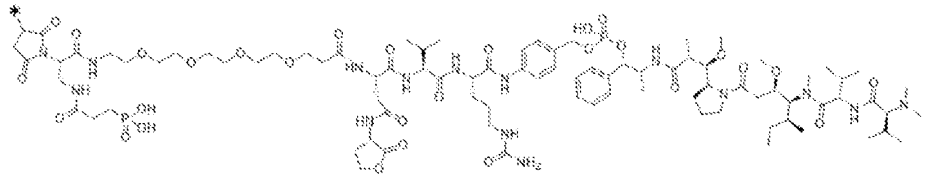
（４）ＣＤＨ３との結合能を有する、前記（１）又は（２）に記載した抗体の部分配列からなる抗体：

であり、

前記のリンカーを有する化学療法剤が、

式（ｘ）：

[化3]

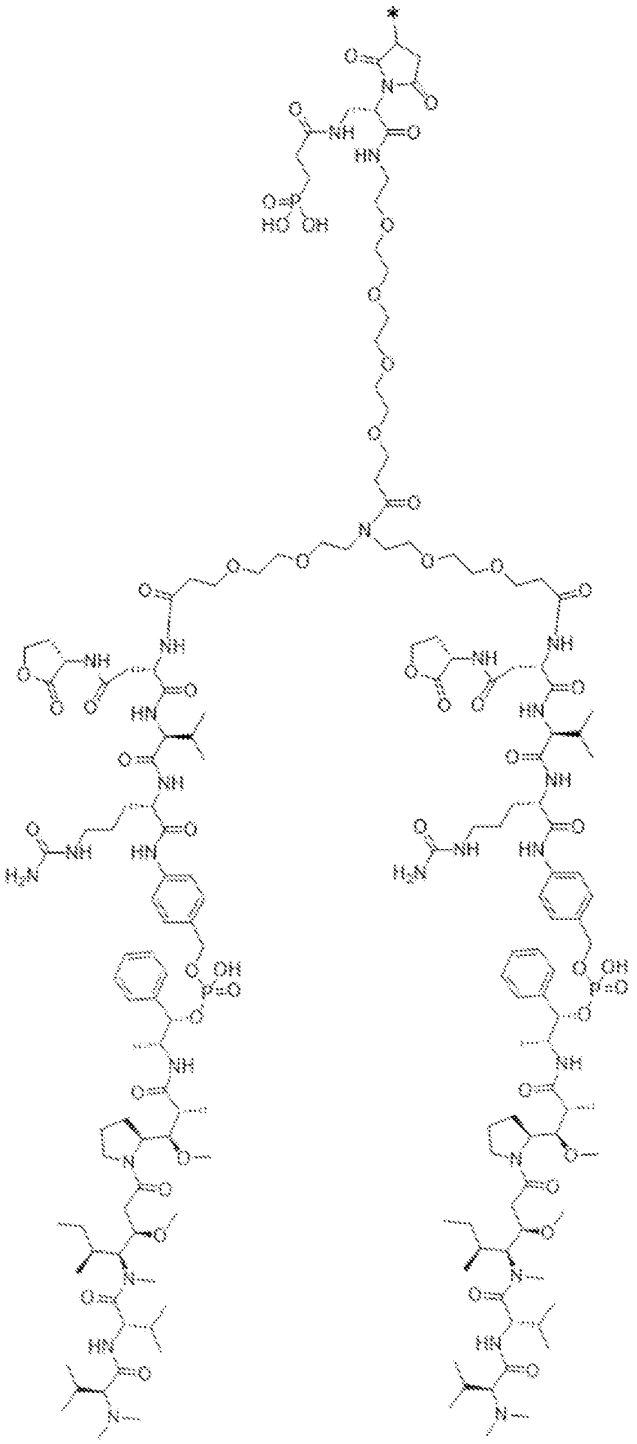


（式中、＊が抗体との接続部分を示す。）

または、

式（ｙ）：

[化4]



（式中、＊が抗体との接続部分を示す。）

である抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物に関する。

本発明においては、リンカーを有する化学療法剤として、上記の式（ｘ）または上記の式（ｙ）で示されるものを使用するが、式（ｘ）または式（ｙ）で示されるもの以外の他のリンカーを有する化学療法剤（例えば、リンカーの一部の化学構造が異なっていても良く、化学療法剤としてモノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）またはエリブリン（Ｅｒｉｂｕｌｉｎ）などを使用するもの）を使用した場合には、本発明の抗体・薬物コンジュゲートよりも薬効が弱いことが判明している。

[0015] ＜抗ＣＤＨ３ヒト化抗体＞

本発明の抗体は、以下の何れかの抗体である。

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

[0016] 本発明の抗体は、好ましくは、以下の何れかの抗体である。

（１）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体

（２）配列番号７に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[0017] 本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体は、ＣＤＨ３（好ましくはヒトＣＤＨ３）を特異的に認識する抗体から規定されるＣＤＲ配列と種々の適切なヒト由来ＦＲ配列を組み合わせることにより提供され、更には親和性を改善するために適切なアミノ酸変異を導入することにより提供される。

[0018] 一態様では、本発明の抗体は細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合する。

一態様では、本発明の抗体はＣＤＨ３領域内のエピトープに結合する。好ましくは、本発明の抗体は、ヒト細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合し、特に好ましくはがん細胞表面に発現されるＣＤＨ３に結合する。

[0019] 本発明の抗体を作成するための抗原としては、ＣＤＨ３（好ましくはヒトＣＤＨ３）又はその部分ペプチドを用いることができる。一例としては、ＣＤＨ３細胞外領域（国際公開ＷＯ２０１４／１２６１９８号公報の配列番号２の１０８から６５４アミノ酸に相当する）に相当する可溶型ＣＤＨ３タンパク質などを用いることができるが、これに限定されるものではない。

[0020] 本発明の抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。ヒト化モノクローナル抗体を取得するための材料として、本発明ではマウスへの免疫を経てハイブリドーマを取得する。このような材料は当該分野で周知な種々の方法で取得することができる。例えば以下に記載する方法でも得ることが出来るが、これに限定されるものではない。

[0021] ＣＤＨ３特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ樹立のためには、先ずＣＤＨ３又はその部分ペプチドを抗原としてマウスに投与する。１匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは０．１～１００ｍｇであり、アジュバントを用いるときは１～１００μｇである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（ＦＣＡ）、フロイント不完全アジュバント（ＦＩＡ）、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは２～５週間間隔で、１～１０回、好ましくは２～５回免疫を行う。そして、最終の免疫日から１～６０日後、好ましくは１～１４日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

[0022] ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。ミエローマ細胞は、ＨＡＴ培地等への薬剤選択性を有し一般に入手可能なマウス由来の株化細胞を使用することができる。例えば　Ｐ３Ｘ６３

－Ａｇ．８．Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）、ＮＳ－１などが挙げられる。

[0023] 細胞融合は、血清を含まないＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０培地などの動物細胞培養用培地中で、１×１０^{6}～１×１０^{7}個／ｍＬの抗体産生細胞と２×１０^{5}～２×１０^{6}個／ｍＬのミエローマ細胞とを混合し、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行うことができる。細胞融合促進剤として、平均分子量１０００～６０００ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

[0024] ハイブリドーマは、選択培地の培養操作により得ることができる。細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有ＲＰＭＩ－１６４０培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に３×１０^{5}個／ｗｅｌｌ程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、１４日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

[0025] 次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によって、ＣＤＨ３と結合する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できる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立することができる。

[0026] 樹立したハイブリドーマを材料とすれば、これに由来した抗体のヒト化は既知の方法で達成することができる。具体的には、マウス抗体のＣＤＲ配列とヒト抗体のＦＲ配列を連結するように設計したＤＮＡ配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからＰＣＲ法により合成する。得られたＤＮＡをヒト抗体定常領域をコードするＤＮＡと連結し、次いで発現ベクターに組み込み、これを宿主に導入し産

生させることにより得られる（ＥＰ２３９４００号公報、国際公開ＷＯ９６／０２５７６号公報など）。

[0027] ＣＤＲ配列は、抗体間の可変領域で特に相違が激しく、その抗体の特異性決定に極めて重要な役割を果たす配列領域を示す。この領域に属するアミノ酸残基は、抗原に対する結合性および特異性に直接的に関わる残基を多く含んでいると考えられ、軽鎖及び重鎖可変領域に各々３領域が存在する。

ＣＤＲ配列はＫａｂａｔら（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ （１９９１）によって配列比較により規定され、Ｃｈｏｔｈｉａら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７））により三次元構造によっても規定される。

[0028] ＫａｂａｔがＣＤＲは、一般的に軽鎖可変領域は残基２４－３４付近、残基５０－５６付近、残基８９－９７付近に位置し、重鎖可変領域では残基３１－３５付近、残基５０－６５付近、残基９５－１０２付近に位置するとされるが、この領域の全ての残基が抗原結合に直接関与するとは必ずしも限らず、三次元構造から規定されたＣＤＲ配列と完全に一致するという訳では無い。

[0029] 選択されるヒトＦＲ配列は、適時適切なものが選ばれる。本願明細書においては、最適なアライメントのもとで選択されたヒトの生殖系列に由来するＦＲ配列が使用された。

[0030] 即ち、マウス抗体の可変領域配列を既知の公開されたヒト可変領域配列ライブラリーに対してスクリーニングする。その中で最も配列的に近似したヒト可変領域配列をヒト化抗体の生殖系列に由来したヒトＦＲ配列として用いることができる（Ｓｉｍｓら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．；１５１，ｐ２２９６（１９９３）、Ｃｈｏｔｈｉａら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．；１９６，ｐ９０１（１９８７）、Ｔｅｍｐｅｓｔら．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；９

，ｐ２６６（１９９１））。

[0031] 最も配列的に近似した生殖系列配列は、そのようなライブラリーを多数登録したデータベースにおいて元抗体の配列に対するアライメント（例えば、ＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｈｕｍａｎｌｇ））を実施することで確かめることができる。

[0032] 選ばれたＦＲ配列がヒト化に適当であるかどうかは、各抗体クローンＣＤＲ配列との組み合わせが適切であり、結合を目指す抗原に対して適切な立体構造を維持しえたか否かによって判断することができる。

[0033] もしＣＤＲ配列とヒトに由来したＦＲ配列を挟んで移植することで発現したヒト化抗体が、その配列選択が適切でない場合には親和性が低下することもしばしば起こりえる。これはＦＲ配列中に存在する残基も、その構造維持において重要な役割を果たすものが存在することを意味する。この事象に対応したアミノ酸残基置換を行うことができる。例えば、アライメントの結果、ヒト由来の配列と位置的に相同な場所に存在するマウス抗体由来のアミノ酸と同じ残基へと置換（ｒｅｓｈａｐｅ）することができる。これによりヒト化によって生じた親和性の低下を改善することができる場合がある。

[0034] 置換されるべきアミノ酸残基の位置は、対象とする抗体によって異なり、多くの場合、実際に発現させるまで特定されない。以下の実施例においては、比較的多くの文献（例えば、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ；８９，ｐ４２８５（１９９２））において置換が実施される軽鎖可変領域の５５位、重鎖可変領域の４９位、７１位、及び７８位から選択される１以上の位置のアミノ酸残基を置換することによって、親和性低下に対する向上を図ることが意図されたが、その置換位置、組み合わせ及び置換後のアミノ酸残基の種類は任意であり、これに限定されるものではない。

[0035] 抗体を生産するための宿主は哺乳動物起源のものが多いが、当業者であれば、発現したい遺伝子産物に最も適する特定の宿主細胞系を適宜選択することができる。一般的な宿主細胞系としては、ＣＨＯ由来細胞株（チャイニー

ズハムスター卵巣細胞系）、ＣＶ１（サル腎臓系）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原をするＣＶ１の誘導体）、ＳＰ２／０（マウスミエローマ）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ３．６５３（マウスミエローマ）、２９３（ヒト腎臓）、及び２９３Ｔ（ＳＶ４０Ｔ抗原をする２９３の誘導体）などが挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞系は、各種メーカー、ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、または文献に記載の論文発表機関から入手することができる。

[0036]　宿主細胞系としては、好ましくはｄｇｆｒ遺伝子の発現欠損であるＣＨＯ由来細胞株又はＳＰ２／０を使用することができる（Ｕｒｌａｎｄ，　Ｇ．ら、Ｓｏｍａｔ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．；１２，ｐ５５５５（１９８６）（非特許文献４）、およびＳｃｈｕｌｍａｎ，　Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ；２７６，ｐ２６９（１９７８）（非特許文献５））。最も好ましくは、宿主細胞系はＤＨＦＲ欠失ＣＨＯである。

[0037]　宿主細胞中へのプラスミドのトランスフェクションは、任意の技術を使って実施できる。具体的な方法としては、トランスフェクション（リン酸カルシウム法、ＤＥＡＥ法、リポフェクション、およびエレクトロポレーションを含む）、センダイウイルス等のエンベロープを利用してＤＮＡを導入する方法、マイクロインジェクション、およびレトロウイルスウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクターを用いた感染が挙げられるが、これらに限定されるものではない（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　Ｃｈａｐｔｅｒ　９　Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ＤＮＡ　ｉｎｔｏ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｃｅｌｌｓ，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，　Ｉｎｃ．）。最も好ましいのは、エレクトロポレーションによる宿主中へのプラスミド導入である。

[0038]　これらの抗体は、ＣＤＨ３との結合能を有する限り、一価抗体、二価抗体、多価抗体のいずれでもよい。また、これらの抗体は、ＣＤＨ３との結合能を有する限り、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体、抗体の修飾物、または抗体の部分配列などであってもよい。抗体断片（フラグメント）等

の低分子化抗体としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ＳｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ）、Ｄｉａｂｏｄｙなどが挙げられる。さらに、抗体断片や低分子化抗体、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ＳｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｈａｉｎ　Ｆｖ）、ＤｉａｂｏｄｙなどにＦｃ部分を融合したものでもよい。このような抗体を得るには、これら抗体をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい。

[0039] ＜リンカーを有する化学療法剤＞

リンカーを有する化学療法剤としては、上記した式（ｘ）または式（ｙ）で示されるものを使用する。

式（ｘ）で示されるリンカーを有する化学療法剤において、抗体と連結前の化合物は、ＷＯ２０２３１６３２２７に記載の参考例３、ＷＯ２０２３１６３２３４に記載の実施例３、ＷＯ２０２３２３４４２６に記載の参考例Ａ３、または、ＷＯ２０２３２３４４２７に記載の実施例Ａ３と同様の方法を用いて合成することができる。

式（ｙ）で示されるリンカーを有する化学療法剤において、抗体と連結前の化合物は、ＷＯ２０２３２３４４２６に記載の参考例２、または、ＷＯ２０２３２３４４２７に記載の実施例２と同様の方法を用いて合成することができる。

[0040] ＜抗体と、リンカーを有する化学療法剤との連結方法＞

抗体と、リンカーを有する化学療法剤との連結は、特許文献３～６（国際公開ＷＯ２０２３／１６３２２７号公報、国際公開ＷＯ２０２３／１６３２３４号公報、国際公開ＷＯ２０２３／２３４４２６号公報、国際公開ＷＯ２０２３／２３４４２７号公報）の記載などに準じた方法で行うことができる。

[0041] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列１分子あたりに結合している化学療法剤の分子数は特に限定されないが、好ましくは１～１６分子、より好ましくは６～１６分子の化学療法剤が結合している。一例としては、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体、その断片又はその部分配列１分子あたり１～１６

個のオーリスタチンＥが結合していてもよい。

また、本発明の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と薬物とのコンジュゲートは、

一般式（Ｉ）：　Ａ－（Ｂ－Ｃ）a

（式中、Ａは、還元した抗体からスルフヒドリル基を除いた部分であり、Ｂは、基－Ｓ－であり、Ｃは、リンカーを有する化学療法剤であり、ａは抗体１分子あたりのリンカー・薬物単位（Ｂ－Ｃ）の平均結合数であり、小数を含んでいてもよい１～１０の数である。以下、ＡＤＣに関しては、抗体１個当たりの薬物の平均結合数、または薬物／抗体比を「ＤＡＲ」と称し、少数を含んでいてもよい１～２０の数であり、本明細書においては小数第１位または小数第２位で表示する。）

で表すことができる。ＤＡＲは、好ましくは２～１８の数であり、より好ましくは３～１５の数である。

[0042] ＜抗体・薬物コンジュゲートの形態＞

本明細書記載の「薬理上許容される塩」としては、リチウム、ナトリウム、およびカリウム等のアルカリ金属塩；マグネシウム、およびカルシウム等の第２族金属塩；アルミニウムまたは亜鉛との塩；アンモニア、コリン、ジエタノールアミン、リジン、エチレンジアミン、ｔｅｒｔ－ブチルアミン、ｔｅｒｔ－オクチルアミン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、Ｎ－メチル－グルコサミン、トリエタノールアミン、およびデヒドロアビエチルアミン等のアミンとの塩；塩化水素、臭化水素、ヨウ化水素、硫酸、硝酸、およびリン酸等の無機酸との塩；ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマール酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、およびベンゼンスルホン酸等の有機酸との塩；またはアスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸との塩が挙げられる。さらに、「薬理上許容される塩」には、分子内塩も包含される。

[0043] 本発明の抗体・薬物コンジュゲート、及びその薬理上許容される塩、のいずれも水和物または溶媒和物として取得される場合があるが、本発明はそれ

らのいずれをも含む。

本発明の抗体・薬物コンジュゲート、またはその塩は、大気中に放置したり、または再結晶することにより、水分を吸収し、吸着水がついたり、水和物になる場合が有り、そのような水を含む抗体・薬物コンジュゲート、またはその塩も、本発明に包含される。

[0044] 本発明の抗体・薬物コンジュゲートのリンカーを有する化学療法剤部に不斉中心を有する部分構造が含まれ光学異性が生じ得る場合には、いずれの光学異性体も本発明に含まれる。

[0045] 本発明には、種々の放射性または非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の抗体・薬物コンジュゲートを構成する原子の一つ以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位体としては、例えば、重水素（^{2}Ｈ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、ヨウ素－１２５（^{125}Ｉ）または炭素－１４（^{14}Ｃ）等を挙げることができる。また、本発明の抗体・薬物コンジュゲートは、例えば、トリチウム（^{3}Ｈ）、ヨウ素－１２５（^{125}Ｉ）または炭素－１４（^{14}Ｃ）のような放射性同位体で放射性標識され得る。放射性標識された化合物は、治療または予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。本発明の抗体・薬物コンジュゲートの全ての同位体変異種は、放射性であると否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

[0046] ＜医薬および使用方法＞

本発明によれば、本発明の抗体・薬物コンジュゲートを含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬が提供される。

ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患としては、ＣＤＨ３がその細胞に発現しているものであれば特に限定されないが、例えば、腫瘍またはがんを挙げることができる。例えば、リンパ腫（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫）および白血病などの造血系の腫瘍もしくはがん、および固形腫瘍もしくは固形癌が挙げられる。造血系の腫瘍、もしくはがんの例としては、濾胞性リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫

急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、および多発性骨髄腫が挙げられる。固形腫瘍もしくは固形癌の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（endotheliosarcoma）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（lymphangioendotheliosarcoma）、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、カポジ肉腫、結腸癌、結腸直腸癌、腎臓癌、膵臓癌、骨癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、口腔癌、鼻腔癌、咽喉癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆道癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、小細胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、甲状腺癌、神経膠腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、皮膚癌、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫等が挙げられるが、治療対象となる腫瘍細胞としては、ＣＤＨ３を発現している腫瘍細胞であればよい。

[0047] 本発明の抗体・薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して投与することができるが、好ましくはヒトである。

本発明の抗体・薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質は、本分野において通常使用される製剤添加物およびその他の物質から任意に選択される。

[0048] 本発明の抗体・薬物コンジュゲートは、１種以上の薬学的に許容される成分を含む医薬組成物として投与され得る。例えば、前記の医薬組成物は、代表的には、１種以上の薬学的に許容されるキャリアを含む。当該キャリアとしては、例えば、滅菌した液体（例えば、水、鉱油、動物油、植物油（例えば、落花生油、大豆油、ごま油）等を含む。水は、前記の医薬組成物が静脈内投与される場合の代表的なキャリアである。食塩水溶液、デキストロース水溶液、およびグリセロール水溶液も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。賦形剤としては本分野で公知の種々の薬理学的に

許容される物質が使用され得る。前記の医薬組成物は、必要に応じて、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはｐＨ緩衝化剤をも含み得る。薬学的に許容されるキャリアの例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載されている。

[0049] 本発明の抗体・薬物コンジュゲートは様々な経路で投与され得る。好ましい投与経路は、非経口投与であり、非経口投与としては、皮下注入、静脈内注入、筋内注入、または胸骨下注入（intrasternal injection）等が挙げられる。より好ましくは静脈内投与であり、点滴またはボーラス注入が可能である。

[0050] ヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物は常法に従って処方される。静脈内投与のための代表的な医薬組成物は、滅菌された等張性の水性緩衝液の溶液である。前記の医薬組成物は、必要に応じて、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。

[0051] 前記の医薬組成物は、本発明の抗体・薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいが、抗体・薬物コンジュゲートと、それ以外に１つ以上の抗腫瘍薬を含む医薬組成物であってもよい。

[0052] 本発明の抗体・薬物コンジュゲートは、他の抗腫瘍薬と共に投与することもでき、これによって抗腫瘍の効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗腫瘍薬は、抗体・薬物コンジュゲートと同時に、別々に、または連続して投与されてもよく、また、それぞれについて投与間隔を変えて投与してもよい。このような抗腫瘍薬として、ａｂｒａｘａｎｅ、ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ、ｃｉｓｐｌａｔｉｎ、ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ、ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ（ＣＰＴ－１１）、ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ、ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ、ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、ｖｉｎｂｌａｓｔｉｎ、または国際公開第ＷＯ２００３／０３８０４３号パンフレットに記載の薬物、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

）、アロマターゼ阻害薬（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物であれば限定されることはない。このような医薬組成物は、凍結乾燥製剤または液状製剤として製剤化され得る。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を加えて製剤化してもよい。これは液状製剤においても同様である。

[0053] 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても異なるが、医薬組成物に含まれる抗体・薬物コンジュゲートのＣＤＨ３に対する親和性、および結合している抗腫瘍性薬物の抗腫瘍活性によって変わり得る。本発明の抗体・薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約０．００１～１００ｍｇ／ｋｇを１回あるいは１～１８０日間に１回の間隔で複数回投与すればよい。

[0054] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、これの目的は例示的なものであって、本発明の内容が実施例によって限定されるものではない。なお本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0055] 参考例１：ヒト化抗体作製方法

（１）抗ＣＤＨ３マウス抗体の作製

抗ＣＤＨ３マウス抗体を特許第６３７７６０１号の実施例１から実施例９に記載の通りに抗ＣＤＨ３マウス抗体を作製し、抗ＣＤＨ３マウス抗体の配列解析から可変領域の配列を得た。

[0056] 配列解析はＡｐＥ及びＧＥＮＥＴＹＸ（株式会社ゼネティックス）を使用した。遺伝子のアライメントにはＣＬＵＳＴＡＬＷを使用した。遺伝子、およびタンパク質情報取得・確認にはＨＰＲＤ，　ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴ，ＵＣＳＦ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，　Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）－　Ｂｌａｔ，　ＵｎｉＰｒｏｔを使用した。

[0057] これにより配列決定されたマウスハイブリドーマに由来する抗ＣＤＨ３マ

ウス抗体の可変領域のうち、Ｔ００４のＣＤＲ配列に相当するアミノ酸配列を以下に示す。

ＳＬＴＳＹＧＶＨ　　：配列番号９（ＣＤＲ－Ｈ１）

ＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤ　　：配列番号１０（ＣＤＲ－Ｈ２）

ＡＲＮＳＮＮＧＦＡＹ　　：配列番号１１（ＣＤＲ－Ｈ３）

ＮＩＹＳＮＬＡ　　：配列番号１２（ＣＤＲ－Ｌ１）

ＬＬＶＹＡＡＫＮ　　：配列番号１３（ＣＤＲ－Ｌ２）

ＱＨＦＹＤＴＰＷＴ　　：配列番号１４（ＣＤＲ－Ｌ３）

加えて、Ｔ００４ｂのＣＤＲ配列に相当するアミノ酸配列を以下に示す。

ＧＹＳＦＴＡＹＮ：配列番号１５（ＣＤＲ－Ｈ１）

ＩＤＰＹＳＧＩＩ：配列番号１６（ＣＤＲ－Ｈ２）

ＡＲＲＧＹＹＤＧＧＦＤＹ：配列番号１７（ＣＤＲ－Ｈ３）

ＱＤＩＴＮＹ：配列番号１８（ＣＤＲ－Ｌ１）

ＹＴＳ：配列番号１９（ＣＤＲ－Ｌ２）

ＱＱＤＳＫＨＰＲＴ：配列番号２０（ＣＤＲ－Ｌ３）

なお、ＣＤＲ－Ｈ１、Ｈ２及びＨ３は重鎖を、ＣＤＲ－Ｌ１、Ｌ２及びＬ３は軽鎖を構成するＣＤＲ配列を表す。示したＣＤＲのアミノ酸配列は抗ＣＤＨ３マウス抗体可変域の塩基配列をＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｈｕｍａｎｌｇ）で検索することにより得た。

[0058] （２）抗ＣＤＨ３抗体の一過性発現ベクターの作製

キメラ化に際し、軽鎖についてはヒトＣｋをコードするキメラ軽鎖発現ベクターにＣＤＨ３マウス抗体の軽鎖可変領域の遺伝子を接続した遺伝子を設計した。重鎖についてはヒトＣｇ１領域をコードするベクターにＣＤＨ３マウス抗体の重鎖可変領域をコードする遺伝子を接続し設計した。

[0059] ヒト化に際してはマウス由来ＣＤＲ配列とヒト由来ＦＲ配列を組み合わせ、更にヒトＦｃ領域を連結してヒト化抗体発現ベクターを用いて安定生産株

を構築した。より具体的には以下の通りである。

[0060] マウスＦＲ配列に相当する領域をヒトに由来したＦＲ配列に入れ替え、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社で全長人工合成した。ＦＲ配列に相当する領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列ＦＲ配列を用いた。生殖系列ＦＲ配列はクローニングされた抗ＣＤＨ３マウス抗体の塩基配列をＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｈｕｍａｎｌｇ）に入力し、最も類似度の高い配列を選択して設計した。また、親和性低下に対応したアミノ酸配列の置換（ｒｅｓｈａｐｅ）も実施した。

[0061] 今回用いた抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の重鎖あるいは軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示した。

なお、Ｔ００４及びＴ００４ｂはそれぞれの親マウス抗体のＦＲ配列に最も類似したヒト生殖系列ＦＲ配列を用いている。また、Ｔ００４及びＴ００４ｂは付記したようなアミノ酸配列の置換を導入している。

[0062] 抗体番号：Ｔ００４－ＶＨ

ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＴＳＹＧＶＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＫＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＮＳＮＮＧＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１）

（選択された生殖系列ＦＲ配列に対し、Ｒ７１Ｋ、Ｌ７８Ｖに置換されている）

[0063] 抗体番号：Ｔ００４－ＶＬ

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＮＩＹＳＮＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＶＹＡＡＫＮＬＡＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＨＦＹＤＴＰＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号２）

（選択された生殖系列ＦＲ配列に対し、Ｅ５５Ａに置換されている）

[0064] 抗体番号：Ｔ００４ｂ－ＶＨ

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＴＶＫＩＳＣＫＶＳＧＹＳＦＴＡＹＮＭ
ＨＷＶＱＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧＦＩＤＰＹＳＧＩＩＴＹＡＥＫＦＱＧＲＶ
ＴＩＴＶＤＫＳＴＤＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＧＹＹ
ＤＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号３）

（選択された生殖系列ＦＲ配列に対し、Ａ７２Ｖ、Ｔ７４Ｋに置換されている）

[0065] 抗体番号：Ｔ００４ｂ－ＶＬ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ
ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧ
ＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＤＳＫＨＰＲＴＦＧＱＧＴ
ＫＶＥＩＫ（配列番号４）

（選択された生殖系列ＦＲ配列に対し、Ｅ５５Ｈに置換されている）

[0066] これらの配列を持つように設計した人工合成配列遺伝子を、重鎖可変領域の遺伝子についてはヒトＩｇＧ１由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたｐＣＸＮベクターに組み込み、軽鎖可変領域の遺伝子についてはヒトκ鎖由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたｐＣＸＮベクターに組み込んだ。

[0067] これを発現させて得られた抗ＣＤＨ３ヒト化抗体のアミノ酸の全長配列を以下に示した。ここで抗ＣＤＨ３ヒト化抗体Ｔ００４はＨ鎖がＴ００４－Ｈ、Ｌ鎖がＴ００４－Ｌからなり、抗ＣＤＨ３ヒト化抗体Ｔ００４ｂはＨ鎖がＴ００４ｂ－Ｈ、Ｌ鎖がＴ００４ｂ－Ｌからなる。

抗体番号：Ｔ００４－Ｈ

ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＶＶＱＰＧＲＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＴＳＹＧＶ
ＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧＶＩＷＳＧＧＳＴＤＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴ
ＩＳＫＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＮＳＮＮＧ
ＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ
ＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰ
ＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫ
ＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳ

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK（配列番号５）

[0068] 抗体番号：Ｔ００４－Ｌ

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYSNLA
WYQQKPGKAPKLLVYAAKNLASGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQHFYDTPWTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC（配列番号６）

[0069] 抗体番号：Ｔ００４ｂ－Ｈ

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYSFTAYNM
HWVQQAPGKGLEWMGFIDPYSGIITYAEKFQGRV
TITVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGYY
DGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF

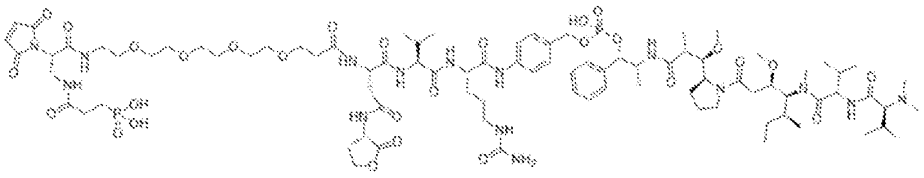
ＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ（配列番号７）

[0070] 抗体番号：Ｔ００４ｂ－Ｌ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＹＴＳＲＬＨＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣＱＱＤＳＫＨＰＲＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号８）

[0071] ＜合成例１＞ＰＧＡＰ－１

[化5]



（（６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，３１Ｓ）－１－アミノ－６－（（４－（（（（（１Ｓ，２Ｒ）－２－（（２Ｒ，３Ｒ）－３－（（Ｓ）－１－（（３Ｒ，４Ｓ，５Ｓ）－４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（ジメチルアミノ）－３－メチルブタンアミド）－Ｎ，３－ジメチルブタンアミド）－３－メトキシ－５－メチルヘプタノイル）ピロリジン－２－イル）－３－メトキシ－２－メチルプロパンアミド）－１－フェニルプロポキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）フェニル）カルバモイル）－３１－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－９－イソプロピル－１，８，１１，１４，３０，３４－ヘキサオキソ－１２－（２－オキソ－２－（（（Ｓ）－２－オキソテトラヒドロフラン－３－イル）アミノ）エチル）－１７，２０，２３，２６－テトラオキサ－２，７，１０，１３，２９，３３－ヘキサアザヘキサトリアコンタン－３６－イル）ホスホン酸

[0072] 合成例１の化合物は、ＷＯ２０２３１６３２２７に記載の参考例３、ＷＯ２０２３１６３２３４に記載の実施例３、ＷＯ２０２３２３４４２６に記載の参考例Ａ３、または、ＷＯ２０２３２３４４２７に記載の実施例Ａ３と同様の方法を用いて合成する事ができる。

合成例１のＭＳを下記に示す。

ＭＳ（ＤＵＩＳ）ｍ／ｚ　１９２１（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

ＭＳ（ＤＵＩＳ）ｍ／ｚ　１９１９（Ｍ－Ｈ）$^{-}$

（分析条件）

装置　：　ＬＣＭＳ－２０５０システム　島津製作所

カラム：　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　Ｃ１８　Ｃｏｌｕｍｎ，１３０Å，１．７μｍ，　２．１ｍｍ　Ｘ　５０ｍｍ　Ｗａｔｅｒｓ

溶離液：　Ａ液：０．１％ギ酸水溶液、Ｂ液：０．１％ギ酸　アセトニトリル溶液

グラジェント（Ｂ％）：２５（０ｍｉｎ）→９５（０．７５ｍｉｎ）→９５（１．５ｍｉｎ）

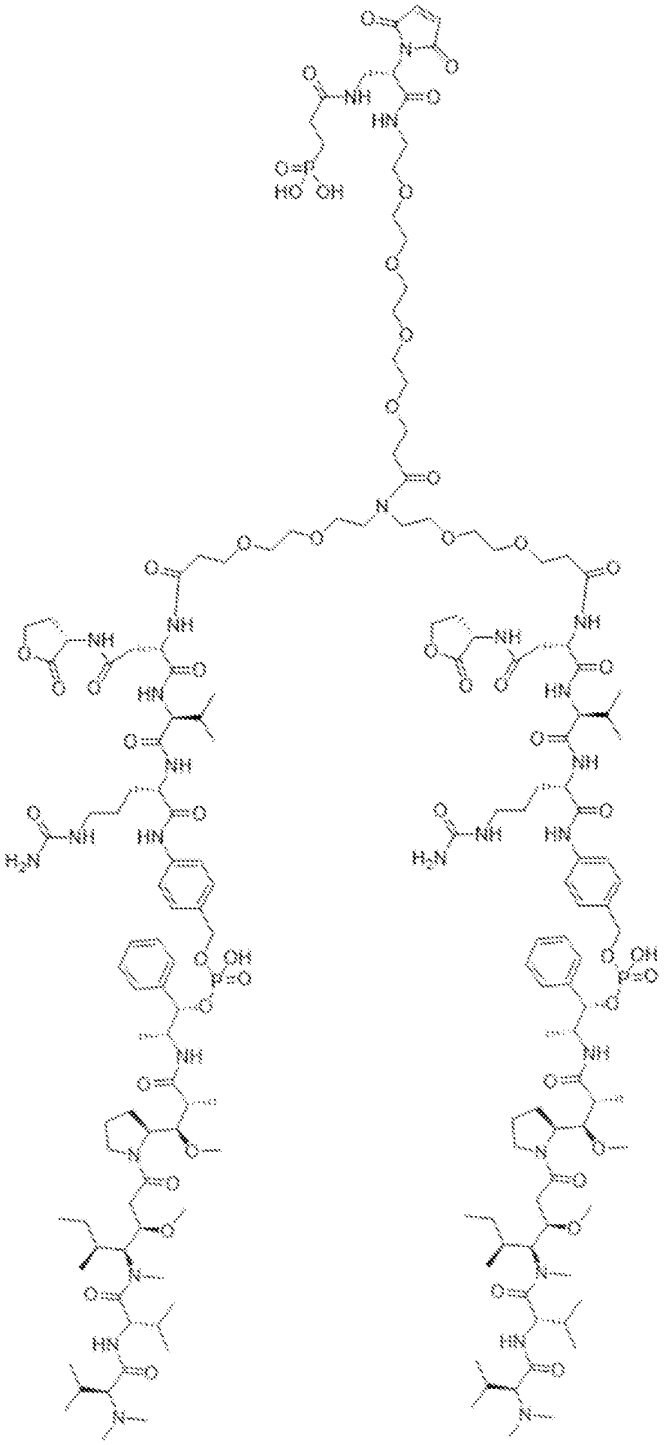
温度　：　４０℃

流速　：　０．８ｍＬ／ｍｉｎ

打ち込み量：５μＬ

[0073] ＜合成例２＞ＰＧＡＰ－２

[化6]



[0074] （（６Ｓ，９Ｓ，１２Ｓ，４１Ｓ）－１－アミノ－２３－（（６Ｓ，９Ｓ，

１２Ｓ）－１－アミノ－６－（（４－（（（（（１Ｓ，２Ｒ）－２－（（２Ｒ，３Ｒ）－３－（（Ｓ）－１－（（３Ｒ，４Ｓ，５Ｓ）－４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（ジメチルアミノ）－３－メチルブタンアミド）－Ｎ，３－ジメチルブタンアミド）－３－メトキシ－５－メチルヘプタノイル）ピロリジン－２－イル）－３－メトキシ－２－メチルプロパンアミド）－１－フェニルプロポキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）フェニル）カルバモイル）－９－イソプロピル－１，８，１１，１４－テトラオキソ－１２－（２－オキソ－２－（（（Ｓ）－２－オキソテトラヒドロフラン－３－イル）アミノ）エチル）－１７，２０－ジオキサ－２，７，１０，１３－テトラアザドコサン－２２－イル）－６－（（４－（（（（（１Ｓ，２Ｒ）－２－（（２Ｒ，３Ｒ）－３－（（Ｓ）－１－（（３Ｒ，４Ｓ，５Ｓ）－４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（ジメチルアミノ）－３－メチルブタンアミド）－Ｎ，３－ジメチルブタンアミド）－３－メトキシ－５－メチルヘプタノイル）ピロリジン－２－イル）－３－メトキシ－２－メチルプロパンアミド）－１－フェニルプロポキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）メチル）フェニル）カルバモイル）－４１－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロロ－１－イル）－９－イソプロピル－１，８，１１，１４，２４，４０，４４－ヘプタオキソ－１２－（２－オキソ－２－（（（Ｓ）－２－オキソテトラヒドロフラン－３－イル）アミノ）エチル）－１７，２０，２７，３０，３３，３６－ヘキサオキサ－２，７，１０，１３，２３，３９，４３－ヘプタアザヘキサテトラコンタン－４６－イル）ホスホン酸

[0075] 合成例２の化合物は、ＷＯ２０２３２３４４２６に記載の参考例２、または、ＷＯ２０２３２３４４２７に記載の実施例２と同様の方法を用いて合成することができる。

合成例２のＭＳを下記に示す。

ＭＳ（ＤＵＩＳ）ｍ／ｚ　１７９７（Ｍ＋２Ｈ）$^{2+}$

ＭＳ（ＤＵＩＳ）ｍ／ｚ　１７９５（Ｍ－２Ｈ）$^{2-}$

（分析条件）

装置　：　ＬＣＭＳ－２０５０システム　島津製作所

カラム：　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　Ｃ１８　Ｃｏｌｕｍｎ，１３０Å，１．７μｍ，２．１ｍｍ　Ｘ　５０ｍｍ　Ｗａｔｅｒｓ

溶離液：　Ａ液：０．１％ギ酸水溶液、Ｂ液：０．１％ギ酸　アセトニトリル溶液

グラジェント（Ｂ％）：　２５（０ｍｉｎ）→９５（０．７５ｍｉｎ）→９５（１．５ｍｉｎ）

温度　：　４０℃

流速　：　０．８ｍＬ／ｍｉｎ

打ち込み量：５μＬ

[0076] ＜抗体・薬物コンジュゲートの合成＞

以下の方法により、本発明の抗体・薬物コンジュゲートを合成した。なお、以下の各実施例において取得する、または取得した抗体・薬物コンジュゲートを一般式（Ｉ）として表す。

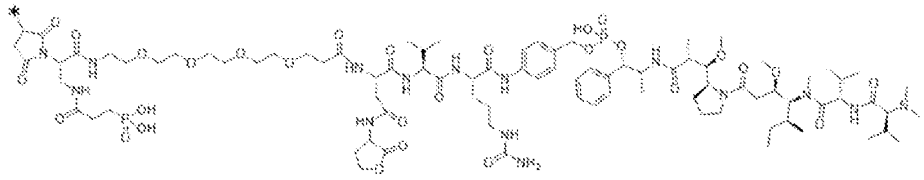
一般式（Ｉ）：　Ａ－（Ｂ－Ｃ）ａ

（式中、Ａは、還元した抗体からスルフヒドリル基を除いた部分であり、Ｂは、基－Ｓ－であり、Ｃは、リンカーを有する化学療法剤であり、ａは抗体１分子あたりのリンカー・薬物単位（Ｂ－Ｃ）の平均結合数であり、小数を含んでいてもよい１～１０の数である。以下、ＡＤＣに関しては、抗体１個当たりの薬物の平均結合数、または薬物／抗体比を「ＤＡＲ」と称し、小数を含んでいてもよい１～２０の数であり、本明細書においては小数第１位または小数第２位で表示する。）

[0077] ＜実施例１：Ｔ００４－ＰＧＡＰ－１（ＡＤＣ１）＞一般式（Ｉ）においてＡが還元した抗体Ｔ００４からスルフヒドリル基を除いた部分であり、Ｂが－Ｓ－であり、Ｃが下記式（ｘ）である抗体・薬物コンジュゲートの合成

式（ｘ）：

[化7]



（式中、＊がＢとの接続部分を示す。）

[0078] ＜１－１＞Ｔ００４のバッファー交換：

リン酸緩衝食塩水（以下、ＰＢＳと称する）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）にＥＤＴＡ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を１０ｍＭとなるよう添加した（以下、ＰＢＳ／ＥＤＴＡと称する）。予めＰＢＳ／ＥＤＴＡにて平衡化したＮＡＰ－１０カラム（Ｃｙｔｉｖａ社製）１本につき、参考例１で得られた原Ｔ００４溶液を１ｍＬ添加した後、１．５ｍＬのＰＢＳ／ＥＤＴＡで溶出させ、Ｔ００４を含む画分（１．５ｍＬ）を分取しＴ００４溶液を得た。Ｔ００４溶液の２８０ｎｍ吸光度をマイクロプレートリーダー（ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅ社製）を用いて測定し、抗体濃度を決定した。（抗体濃度：３．４ｍｇ／ｍＬ）

[0079] ＜１－２＞Ｔ００４の還元：

上記＜１－１＞で得たＴ００４溶液をＰＢＳ／ＥＤＴＡを用いて希釈し、濃度を約２．５ｍｇ／ｍＬに調整した。この溶液０．９９ｍＬを１．５ｍＬマイクロチューブに入れ、ＴＣＥＰ塩酸塩（富士フイルム和光純薬株式会社製）のＰＢＳ／ＥＤＴＡ溶液１０μＬ（抗体一分子に対してＴＣＥＰが６．９当量となるよう）を加えた。３７℃で２時間インキュベートすることにより、抗体Ｔ００４を構成するペプチド鎖間のジスルフィド結合を標的として還元反応を実施し、還元Ｔ００４溶液を得た。

[0080] ＜１－３＞還元したＴ００４とＰＧＡＰ－１（合成例１）とのコンジュゲート形成：

上記＜１－２＞で得た還元Ｔ００４溶液９００μＬに、合成例１で得たＰ

ＧＡＰ－１を含むジメチルスルホキシド溶液１００μＬ（抗体一分子に対してＰＧＡＰ－１が１５当量となるよう）を加え、氷冷下にて１時間反応し、抗体・薬物コンジュゲート（Ｔ００４－ＰＧＡＰ－１）溶液を得た。

[0081] ＜１－４＞参照用の還元Ｔ００４の調整：

還元Ｔ００４溶液９００μＬにジメチルスルホキシド１００μＬを加え、氷冷下にて１時間静置し、参照用還元Ｔ００４溶液を得た。

[0082] ＜１－５＞抗体・薬物コンジュゲートの精製：

予めコンディショニングしたＰｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（ジーエルサイエンス社製、ＭｏｎｏＳｐｉｎ　９６ＷＰ　ＰｒｏＡ）１本につき、上記１－３．で得た抗体・薬物コンジュゲート溶液を２００μＬ添加し、カラムに吸着させた。カラム付属の洗浄バッファーによりカラムを洗浄した後、カラム付属の溶出バッファーにより抗体・薬物コンジュゲートを溶出させた。

ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラムから溶出した抗体・薬物コンジュゲート溶液（１ｍＬ）を、予めＰＢＳ／ＥＤＴＡにて平衡化したＮＡＰ－１０カラムに添加し、１．５ｍＬのＰＢＳ／ＥＤＴＡで溶出させ、抗体・薬物コンジュゲートを含む画分（１．５ｍＬ）を分取し、精製抗体・薬物コンジュゲートを得た。精製抗体・薬物コンジュゲートの２８０ｎｍ吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。（吸光度：１．１９）

[0083] ＜１－５ａ＞試験例用の抗体・薬物コンジュゲートの精製

＜１－５＞と同様の操作を、ＥＤＴＡを含まないＰＢＳにて実施した。（吸光度：１．２２）本操作で得た精製抗体・薬物コンジュゲートを試験例で用いた。

[0084] ＜１－６＞参照用の還元Ｔ００４の精製：

予めコンディショニングしたＰｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（ジーエルサイエンス社製、ＭｏｎｏＳｐｉｎ　９６ＷＰ　ＰｒｏＡ）１本につき、上記＜１－４＞で得た参照用の還元Ｔ００４溶液を２００μＬ添加し、カラムに吸着させた。カラム付属の洗浄バッファーを使用してカラムを洗浄した後、カラム付属の溶出バッファーにより還元Ｔ００４を溶出させ、更に、予めＰＢＳ

／ＥＤＴＡにて平衡化したＮＡＰ－１０カラムに添加し、１．５ｍＬのＰＢＳ／ＥＤＴＡで溶出させ、還元Ｔ００４を含む画分（１．５ｍＬ）を分取し、参照用の精製還元Ｔ００４溶液を得た。精製還元Ｔ００４溶液の２８０ｎｍ吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定し、抗体濃度を決定した。（抗体濃度：０．８５ｍｇ／ｍＬ）

[0085] ＜１－７＞エルマンズアッセイ（Ｅｌｌｍａｎ′ｓ　ａｓｓａｙ）によるＤＡＲ計算

ＰＢＳ／ＥＤＴＡで溶出した精製抗体・薬物コンジュゲート溶液及び参照用の精製還元Ｔ００４溶液をそれぞれのマイクロチューブに４８０μＬ入れ、５，５′ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（富士フイルム和光純薬株式会社製）の１０ｍＭエタノール溶液をそれぞれ２０μＬ添加して混合し、１５分間室温にて反応させた。得られた反応液の４１２ｎｍ吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。濃度既知のＬ－Ｃｙｓｔｅｉｎｅ（富士フイルム和光純薬株式会社製）溶液から得た標準曲線を用いて、精製抗体・薬物コンジュゲート溶液及び精製還元Ｔ００４溶液中の遊離チオール基濃度を得た。（精製抗体・薬物コンジュゲート溶液の遊離チオール基濃度：１．８μＭ、精製還元Ｔ００４溶液の遊離チオール基濃度：５２μＭ）

[0086] （ＤＡＲの計算：一般式（Ｉ）のＣに存在する化学療法剤が１つの場合（ａ＝ＤＡＲ））

還元Ｔ００４の１分子あたりのチオール基数$N_{SH、Ab}$および抗体・薬物コンジュゲートの１分子あたりのチオール基数$N_{SH、ADC}$は以下の式で求めることができる。

$$N_{SH、Ab}=C_{SH、Ab}／C_{Ab}\quad 式（1）$$

$$N_{SH、ADC}=C_{SH、ADC}／C_{ADC}\quad 式（2）$$

（ここで、$C_{SH、Ab}$は還元Ｔ００４溶液中のチオール基濃度を示し、C_{Ab}は還元Ｔ００４溶液の抗体濃度を示し、$C_{SH、ADC}$は抗体・薬物コンジュゲート溶液中のチオール基濃度を示し、C_{ADC}は抗体・薬物コンジュゲート溶液の抗体濃度を示す。なお、理論上$N_{SH、Ab}$が８を上回ることは考えられないため

、式（１）の計算により$N_{SH、Ab}$が８を上回った場合は、８とみなす。）

$N_{SH、Ab}$から$N_{SH、ADC}$を差し引いた分が、抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲと考えることができる。すなわち、抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲを以下の式により計算することができる。

$$DAR = N_{SH、Ab} - N_{SH、ADC} \quad 式（３）$$

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和に等しいことから、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の吸光度について以下の式が成り立つ。

$$A_{ADC、280} = C_{ADC}(\varepsilon_{Ab、280} + DAR \times \varepsilon_{D、280}) \quad 式（４）$$

（ここで、$A_{ADC、280}$は抗体・薬物コンジュゲート溶液の２８０ｎｍ吸光度を示し、C_{ADC}は抗体・薬物コンジュゲートの抗体濃度を示し、$\varepsilon_{Ab、280}$は２８０ｎｍにおけるＴ００４のモル吸光係数を示し、ＤＡＲは抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲを示し、$\varepsilon_{D、280}$は２８０ｎｍにおけるＰＧＡＰ－１のモル吸光係数を示す。）

式（１）、式（２）、式（３）、及び式（４）から、ＤＡＲについて以下の式が成り立つ。

$$DAR = (N_{SH、Ab}A_{ADC、280} - C_{SH、ADC}\varepsilon_{Ab、280}) / (A_{ADC、280} + C_{SH、ADC}\varepsilon_{D、280}) \quad 式（５）$$

式（５）を用い計算した結果、実施例１の抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲ計算値は７．７であった。

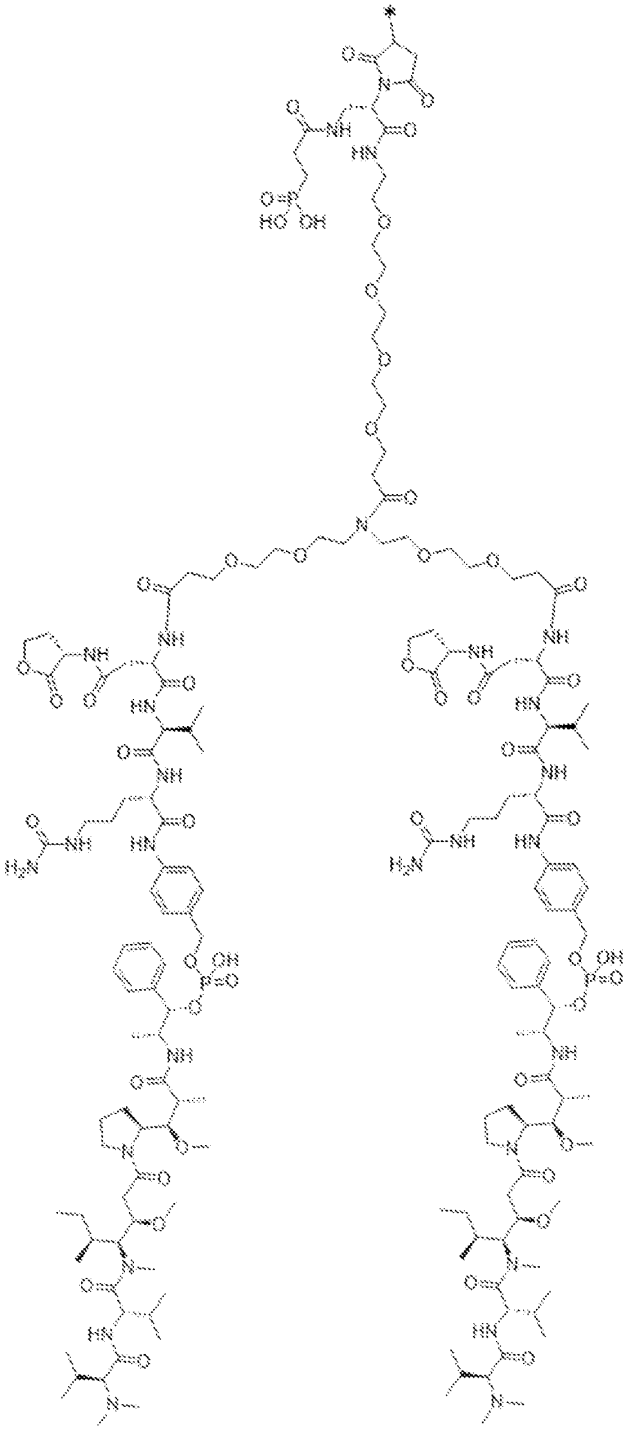
[0087] また、１－５ａ．で得られた、ＰＢＳで溶出させた抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲは、ＰＢＳ／ＥＤＴＡで溶出させた抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲと等しいと考えることができ、式（４）を用いてＰＢＳで溶出させた抗体・薬物コンジュゲート溶液の抗体濃度を求めることができる。（抗体・薬物コンジュゲート濃度：０．８３ｍｇ／ｍＬ。表１には本濃度を記載した。）

[0088] ＜実施例２：Ｔ００４－ＰＧＡＰ－２（ＡＤＣ２）＞一般式（Ｉ）において

Ａが還元した抗体Ｔ００４からスルフヒドリル基を除いた部分であり、Ｂが－Ｓ－であり、Ｃが下記式（ｙ）である抗体・薬物コンジュゲートの合成

式（ｙ）：

[化8]



（式中、＊がＢとの接続部分を示す。）

[0089] Ｔ００４と、ＰＧＡＰ－１の代わりにＰＧＡＰ－２（合成例２）を使用して、実施例１と同様の反応および処理操作を行い、実施例２の抗体・薬物コンジュゲートを取得した。実施例２は、一般式（Ｉ）のＣに二個の化学療法剤が存在しており、この場合ＤＡＲ＝２ａであり、式（５）で得られる値を倍にした値がＤＡＲとなる。

[0090] 実施例３：Ｔ００４ｂ－ＰＧＡＰ－１（ＡＤＣ３）、および実施例４：Ｔ００４ｂ－ＰＧＡＰ－２（ＡＤＣ４）

Ｔ００４の代わりにＴ００４ｂ、および、ＰＧＡＰ－１（合成例１）又はＰＧＡＰ－２（合成例２）を使用して、実施例１又は実施例２と同様の反応および処理操作を行い、それぞれ実施例３および実施例４の抗体・薬物コンジュゲートを取得した。実施例４は、一般式（Ｉ）のＣに二個の化学療法剤が存在しており、式（５）で得られる値を倍にした値がＤＡＲとなる。

[0091] 実施例１～４の結果を表１にまとめて記す。

[表1]

実施例番号	使用した、Ｃ部位を構成するための化合物	取得したコンジュゲート（Ｉ）				
		Ａ	Ｂ	Ｃ	ＤＡＲ計算値	濃度（ｍｇ／ｍＬ）
１	ＰＧＡＰ－１（合成例１）	Ｔ００４’	－Ｓ－	式（ｘ）	７．７	０．８３
２	ＰＧＡＰ－２（合成例２）	Ｔ００４’	－Ｓ－	式（ｙ）	１４．８	０．８２
３ａ	ＰＧＡＰ－１（合成例１）	Ｔ００４ｂ’	－Ｓ－	式（ｘ）	７．３	０．８１
３ｂ	ＰＧＡＰ－１（合成例１）	Ｔ００４ｂ’	－Ｓ－	式（ｘ）	７．６	０．８０
４ａ	ＰＧＡＰ－２（合成例２）	Ｔ００４ｂ’	－Ｓ－	式（ｙ）	１４．２	０．７９
４ｂ	ＰＧＡＰ－２（合成例２）	Ｔ００４ｂ’	－Ｓ－	式（ｙ）	１４．６	０．７８

（表中、Ｔ００４’は、還元した抗体Ｔ００４からスルフヒドリル基を除いた部分を示し、Ｔ００４ｂ’は、還元した抗体Ｔ００４ｂからスルフヒドリル基を除いた部分を示す。実施例３と４は、それぞれ合成を２回行い、それぞれＤＡＲを計算した。）

[0092] ＜実施例５：Ｔ００４ｂ－ＰＧＡＰ－１－ＤＡＲ４（ＡＤＣ５）＞一般式（Ｉ）においてＡが還元した抗体Ｔ００４ｂからスルフヒドリル基を除いた部分であり、Ｂが－Ｓ－であり、Ｃが実施例１に記載の（ｘ）である抗体・薬物コンジュゲートの合成

[0093] ＜５－１＞Ｔ００４ｂのバッファー交換：

リン酸緩衝食塩水（以下、ＰＢＳと称する）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）にＥＤＴＡ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を１０ｍＭとなるよう添加した（以下、ＰＢＳ／ＥＤＴＡと称する）。予めＰＢＳ／ＥＤＴＡにて平衡化したＮＡＰ－１０カラム（Ｃｙｔｉｖａ社製）１本につき、参考例１で得られた原Ｔ００４ｂ溶液を１ｍＬ添加した後、１．５ｍＬのＰＢＳ／ＥＤＴＡで溶出させ、Ｔ００４ｂを含む画分（１．５ｍＬ）を分取しＴ００４ｂ溶液を得た。Ｔ００４ｂ溶液の２８０ｎｍ吸光度をマイクロプレートリーダー（ＦｌｅｘＳｔａｔｉｏｎ３、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅ社製）を用いて測定し、抗体濃度を決定した。（抗体濃度：３．６４ｍｇ／ｍＬ）

[0094] ＜５－２＞Ｔ００４ｂの還元：

上記＜１－１＞で得たＴ００４ｂ溶液をＰＢＳ／ＥＤＴＡを用いて希釈し、濃度を約２．５ｍｇ／ｍＬに調整した。この溶液０．９９ｍＬを１．５ｍＬマイクロチューブに入れ、ＴＣＥＰ塩酸塩（富士フイルム和光純薬株式会社製）のＰＢＳ／ＥＤＴＡ溶液１０μＬ（抗体一分子に対してＴＣＥＰが３．４５当量となるよう）を加えた。３７℃で２時間インキュベートすることにより、抗体Ｔ００４ｂを構成するペプチド鎖間のジスルフィド結合を標的として還元反応を実施し、還元Ｔ００４ｂ溶液を得た。

[0095] ＜５－３＞還元したＴ００４ｂとＰＧＡＰ－１（合成例１）とのコンジュゲート形成：

上記＜１－２＞で得た還元Ｔ００４ｂ溶液９００μＬに、合成例１で得たＰＧＡＰ－１を含むジメチルスルホキシド溶液１００μＬ（抗体一分子に対してＰＧＡＰ－１が１５当量となるよう）を加え、氷冷下にて１時間反応し

、抗体・薬物コンジュゲート（Ｔ００４ｂ－ＰＧＡＰ－１）溶液を得た。

[0096] ＜５－４＞抗体・薬物コンジュゲートの精製：

予めコンディショニングしたＰｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（ジーエルサイエンス社製、ＭｏｎｏＳｐｉｎ　９６ＷＰ　ＰｒｏＡ）１本につき、上記１－３．で得た抗体・薬物コンジュゲート溶液を２００μＬ添加し、カラムに吸着させた。カラム付属の洗浄バッファーによりカラムを洗浄した後、カラム付属の溶出バッファーにより抗体・薬物コンジュゲートを溶出させた。

ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラムから溶出した抗体・薬物コンジュゲート溶液（１ｍＬ）を、予めＰＢＳにて平衡化したＮＡＰ－１０カラムに添加し、１．５ｍＬのＰＢＳで溶出させ、抗体・薬物コンジュゲートを含む画分（１．５ｍＬ）を分取し、精製抗体・薬物コンジュゲートを得た。精製抗体・薬物コンジュゲートの２８０ｎｍ吸光度を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。（吸光度：１．３３）

[0097] ＜５－５＞ＨＩＣ分析による薬物抗体比（ＤＡＲ）測定：

ＰＢＳで溶出した抗体・薬物コンジュゲート溶液のＤＡＲプロファイルの測定は疎水性クロマトグラフィーカラム（ＴＯＳＯＨ製、ＴＳＫｇｅｌ　Ｂｕｔｙｌ－ＮＰＲ、４．６×３５ｍｍ）を備えた高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ、島津製作所製、ＬＣ－２０ＡＤ）を用いて行った。移動相Ａは０．０３Ｍリン酸緩衝液、１．５Ｍ硫酸アンモニウム、ｐＨ７．０からなり、移動相Ｂは９０％ｖ／ｖの０．０３Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）、１０％ｖ／ｖの イソプロパノールからなる。分析のための試料調製は抗体・薬物コンジュゲート溶液を５０％ｖ／ｖの移動相Ａおよび５０％ｖ／ｖの移動相Ｂの混合液で２倍希釈し分析試料とした。抗体・薬物コンジュゲート溶液が高濃度の場合はＰＢＳを用いて１ｍｇ／ｍＬ程度に希釈して試料調製を行った。分析試料１０μＬを流速０．８ｍＬ／ｍｉｎでカラムに注入し、グラジエントモードで３５ｍｉｎ、２８０ｎｍでの吸光度を検出した。グラジエントは移動相Ａを７５％（０．０ｍｉｎ）－３５％（３０．０ｍｉｎ）－５％（３０．１ｍｉｎ）－５％（３５．０ｍｉｎ）に設定した。ソフトウェ

ア（ＬａｂＳｏｌｕｔｉｏｎｓ、島津製作所製）を用いて算出した各ＤＡＲの面積％とＤＡＲ数の積を足して平均ＤＡＲとした。

（抗体・薬物コンジュゲートの平均ＤＡＲ：３．７９）

[0098] ＜５－６＞抗体・薬物コンジュゲート溶液濃度の計算

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和に等しいことから、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の吸光度について以下の式が成り立つ。

$$A_{ADC,280} = C_{ADC}(\varepsilon_{Ab,280} + DAR \times \varepsilon_{D,280}) \quad \text{式（１）}$$

（ここで、$A_{ADC,280}$は抗体・薬物コンジュゲート溶液の２８０ｎｍ吸光度を示し、C_{ADC}は抗体・薬物コンジュゲートの抗体濃度を示し、$\varepsilon_{Ab,280}$は２８０ｎｍにおけるＴ００４ｂのモル吸光係数を示し、ＤＡＲは抗体・薬物コンジュゲートのＤＡＲを示し、$\varepsilon_{D,280}$は２８０ｎｍにおけるＰＧＡＰ－１のモル吸光係数を示す。）

式（１）を用いて、C_{ADC}を求めることができる。（抗体・薬物コンジュゲートのC_{ADC}：０．９５ｍｇ／ｍＬ）

[0099] 実施例６

実施例＜５－１＞と同様の方法で得たＴ００４ｂ溶液をＰＢＳ／ＥＤＴＡを用いて希釈し、濃度を約２．５ｍｇ／ｍＬに調整した。この溶液０．９９ｍＬを１．５ｍＬマイクロチューブに入れ、ＴＣＥＰ塩酸塩（富士フイルム和光純薬株式会社製）のＰＢＳ／ＥＤＴＡ溶液１０μＬ（抗体一分子に対してＴＣＥＰが３．４５当量となるよう）を加えた。４℃で６時間インキュベートし、抗体Ｔ００４ｂ内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元し、還元Ｔ００４ｂ溶液を得た。以降、実施例５と同様の反応および処理操作を行い、実施例６の抗体・薬物コンジュゲートを取得した。（ＡＤＣ６）

[0100] 実施例７

実施例＜５－１＞と同様の方法で得たＴ００４ｂ溶液をＰＢＳ／ＥＤＴＡを用いて希釈し、濃度を約２．５ｍｇ／ｍＬに調整した。この溶液０．９９

ｍＬを１．５ｍＬマイクロチューブに入れ、ＴＣＥＰ塩酸塩（富士フイルム和光純薬株式会社製）のＰＢＳ／ＥＤＴＡ溶液１０μＬ（抗体一分子に対してＴＣＥＰが３．８当量となるよう）を加えた。４℃で６時間インキュベートし、抗体Ｔ００４ｂ内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元し、還元Ｔ００４ｂ溶液を得た。以降、実施例５と同様の反応および処理操作を行い、実施例７の抗体・薬物コンジュゲートを取得した。（ＡＤＣ７）

[0101] 実施例５～７の結果を表２にまとめて記す。

[0102] [表2]

実施例番号	使用した、C部位を構成するための化合物	取得したコンジュゲート（I）				
		A	B	C	平均DAR	濃度（mg／mL）
5a	PGAP－1（合成例1）	T004b’	－S－	式（x）	3．79	0．95
5b	PGAP－1（合成例1）	T004b’	－S－	式（x）	4．54	0．91
6a	PGAP－1（合成例1）	T004b’	－S－	式（x）	3．59	0．95
6b	PGAP－1（合成例1）	T004b’	－S－	式（x）	3．70	0．92
7a	PGAP－1（合成例1）	T004b’	－S－	式（x）	3．57	0．88
7b	PGAP－1（合成例1）	T004b’	－S－	式（x）	3．82	0．90

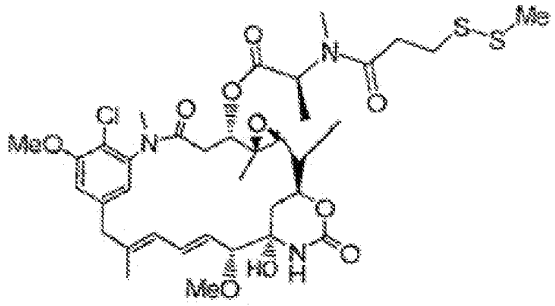
（表中、Ｔ００４ｂ’は、還元した抗体Ｔ００４ｂからスルフヒドリル基を除いた部分を示す。実施例５、６及び７は、合成を２回行い、それぞれＤＡＲを計算した。）

[0103] ＜実施例８：比較用の薬剤結合抗体の調製（対照ＡＤＣ）＞

＜８－１＞薬剤の合成

ＤＭ１ＳＭｅは、米国特許第５，２０８，０２０号および６，３３３，４１０Ｂ１号に以前に記載されたように調製した。

[化9]



[0104] ＜８－２＞結合薬剤の還元処理

エタノール３００μＬで溶解した０．７８ｍｇのＤＭ１ＳＭｅと５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．５）１８０ｕＬ、ＴＣＥＰ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｏｎｄ Ｂｒｅａｋｅｒ、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）２０μＬを混合し、窒素雰囲気下、室温で３０分以上反応させ、薬剤を還元した。

還元薬剤はＨＰＬＣを使用して精製した後に溶媒留去後、１０ｍｇ／ｍＬになるようにジメチルアセトアミドに溶解した。

[0105] ＜８－３＞マレイミド化抗体の調整

１ｍｇ／ｍＬのＴ００４にモル比３０倍過剰となる量のｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ（ＰＩＥＲＣＥ社）を加え、３０℃、１時間反応させた。

過剰な架橋剤を除くため、５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ６．５）で平衡化した脱塩カラムで脱塩処理（ＺｅｂａＳｐｉｎＣｏｌｕｍｎ、 サーモフィッシャーサイエンティフィック社）した。

[0106] ＜８－４＞薬剤による抗体の修飾

１ｍｇ／ｍＬのマレイミド化したＴ００４と、結合したマレイミド基数の１．７倍に相当する還元薬剤とを５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ ＮａＣｌ、２ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ６．５）中で、室温にて一晩反応させた。その後、過剰な薬剤をゲルろ過操作により除いた。

[0107] ＜８－５＞抗体薬剤結合量の定量

抗体当たりの薬剤結合数は、２５２ｎｍおよび２８０ｎｍの吸光度を測定する事で決定した。決定方法は非特許文献（Ｗｉｄｄｉｓｏｎ，Ｗ．Ｃ．，Ｗｉｌｈｅｌｍ，Ｓ．Ｄ．，Ｃａｖａｎａｇｈ，Ｅ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．（２００６） Ｓｅｍｉｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｍａｙｔａｎｓｉｎｅ ａｎａｌｏｇｕｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ． Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，４９，４３９２－４４０８）に記載の吸光係数εAb_{280}＝２２３，０００$M^{-1}cm^{-1}$，εAb_{252}＝８２，５１０$M^{-1}cm^{-1}$，$\varepsilon DM1_{280}$＝５，１８０$M^{-1}cm^{-1}$，$\varepsilon DM1_{252}$＝２６，１６０$M^{-1}cm^{-1}$を利用した。

[0108] ＜実施例９：細胞傷害アッセイ＞

ヒトＣＤＨ３発現細胞株であるＨＣＣ１９５４，ＢｘＰＣ３，ＫＬＭ１を用いてＡＤＣの薬効を評価した。まずこれらの細胞株を３８４ウェルプレート（ｇｒｅｉｎｅｒ）に１，０００細胞／ウェルで播種し、３７℃、５％ＣＯ２で一晩培養した。翌日、予め段階希釈したＡＤＣ１、ＡＤＣ２、ＡＤＣ３、ＡＤＣ４を各ウェルに添加した。インキュベーターで４日間培養後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（プロメガ）を用いて細胞生存率を評価した。培地のみで培養した細胞のウェルの発光値を生存率１００％として各ウェルの生存率を算出した。細胞増殖の５０％阻害または生存の５０％を阻害するのに必要な処理濃度（ＩＣ５０）は、ＸＬｆｉｔ５．２（ＩＤＢＳ）を用いて算出し、比較の際はｐＩＣ５０（Ｌｏｇ（－ＩＣ５０））で比較を行った。

[0109] ＡＤＣ１～ＡＤＣ４における各種細胞株（ＨＣＣ１９５４、ＢｘＰＣ３ ＫＬＭ１）のｐＩＣ５０の結果を表３にまとめた。使用した細胞株において抗体がＴ００４、Ｔ００４ｂであるＡＤＣ１とＡＤＣ３はどちらも強い抗増殖活性を示した（図１）。また、抗体がＴ００４であるＡＤＣ１、ＡＤＣ２あるいは抗体がＴ００４ｂであるＡＤＣ３，ＡＤＣ４においても強い細胞増殖抑制効果を示した（図２および図３）。

[0110] [表3]

	HCC1954	BxPC3	KLM1
ADC1	5．4	4．5	3．4
ADC2	5．6	4．8	4．2
ADC3	5．4	4．3	3．1
ADC4	5．6	4．7	3．9
対照ADC	5．9	3．3	2．6

[0111] ＜実施例１０：ｉｎ　ｖｉｖｏ　マウス薬効試験＞

ヒトすい臓がん細胞株であるＢｘＰＣ３細胞を培養し、移植必要量の２倍程度の数が得られるまで拡大培養した。

移植日に細胞をＰＢＳ（－）で洗浄した後、ＴｒｙｐｌｅＥｘｐｒｅｓｓ(Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社)で剥離し、１，０００ｒｐｍ　５分遠心してペレットを回収した。ペレットを抗生物質および血清不含ＲＰＭＩ－１６４０培地とマトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３５６２３７）に懸濁して５×１０^{6}／ｍｌに調製し、その１００μｌをマウス右側部皮下に移植した。

インビボ試験は各群５匹とし、各投与液を尾静脈より投与した。投与液はＡＤＣ３及びＡＤＣ４をそれぞれ０．５、１、２ｍｇ／ｋｇ、対照ＡＤＣを２ｍｇ／ｋｇとした。投与は平均腫瘍径が約１５０ｍｍ^{3}となった時点で１回投与を行なった。

[0112] 結果を図４～図７に示す。ＡＤＣ３、ＡＤＣ４ともに最小用量の０．５ｍｇ／ｋｇで高い薬効を示した。体重への影響はなかった。

[0113] さらに薬物抗体比（ＤＡＲ）の異なるＡＤＣ３、ＡＤＣ５およびＡＤＣ７のマウスにおける薬効を比較するインビボ試験を実施した。図８に示す通り、平均ＤＡＲ４であるＡＤＣ５及びＡＤＣ７（０．５ｍｇ／ｋｇ）を投与したマウスは平均ＤＡＲ８であるＡＤＣ３（０．５ｍｇ／ｋｇ）と同等の顕著な薬効を示した。また、ＡＤＣを投与したマウスにおいて体重減少はみられなかった（図９）。

[0114] ＜実施例１１：マウス薬物動態試験＞

ＡＤＣ３、ＡＤＣ５およびＡＤＣ７を３ｍｇ／ｋｇの用量でＩＣＲマウスに単回経口投与し継時的（５分、Ｄａｙ３、Ｄａｙ７、Ｄａｙ１４）に血液を採取し、血漿中抗体量（ＴＡｂ）をＥＬＩＳＡで測定した。

ＤＰＢＳ（ＧＩＢＣＯ、１４１９０１４４）中の抗Ｔ００４ｂ抗体（２．５ｕｇ／ｍＬ、抗体溶液、自社調整）の１００μＬの溶液を、ＭａｘｉＳｏｒｐ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、４４２４０４）でコーティングした９６ウェルポリスチレンプレートの各ウェルに加えた。プレートを４℃にて一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含有するＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で３回洗浄した。次いで、ウェルを、１００％ブロックエース（ケーエーシー、ＵＫＢ５００）溶液で室温にて少なくとも１時間ブロックした。ブロック後、プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。検量線を作成するために、抗体またはＡＤＣ溶液をＴＢＳ－Ｔ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ、自社調整）で１０ｎｇ／ｍＬから２倍ずつ７段階希釈して標準液を調整した。血漿試料は任意の希釈倍率から２倍ずつ４段階希釈し調整した。血漿試料および標準液（１００μＬ）をＥＬＩＳＡプレートのウェルに加え、室温にて１時間インキュベートした。インキュベーション後、試料を取り出し、プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。ＨＲＰ－Ｆ（ａｂ’２）　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ－ＩｇＧ　Ｆｃγ（ＪａｃｋｓｏｎＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）の溶液を、ＴＢＳ－Ｔ中で１：１０，０００希釈し、１００μＬを各ウェルに加えた。プレートを室温にて１時間インキュベートした。インキュベーション後、試料を取り出し、プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。ＴＭＢ　Ｓｏｌｕｂｌｅ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ＳｃｙＴｅｋ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）の溶液を、各ウェルに加えた（１００μＬ）。プレートを室温にて１０～２０分間インキュベートし、反応物を１００μＬのＴＭＢ　ＳＴＯＰ　ＢＵＦＦＥＲ（ＳｃｙＴｅｋ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）でクエンチした。Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　ＦＣ吸光マイクロプレートリーダー（

Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）にてプレートを４５０ｎｍおよび６２０ｎｍで読み取った。検量線から各希釈倍率の濃度を算出し、平均値を求めた。

結果を図１０に示す。ＡＤＣ３、ＡＤＣ５、ＡＤＣ７はほぼ同じ体内動態を示し、コンジュゲート前の抗体であるＴ００４ｂとも同じであった。

請求の範囲

[請求項1] 抗ＣＤＨ３ヒト化抗体と、リンカーを有する化学療法剤とが、連結している抗体・薬物コンジュゲートであって、

前記抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が、

（１）配列番号１に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

（２）配列番号３に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体；

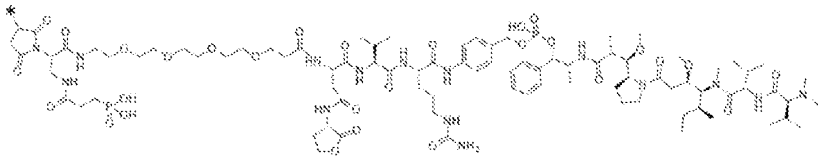
（３）ＣＤＨ３との結合能を有する、前記（１）又は（２）に記載の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体の断片；または

（４）ＣＤＨ３との結合能を有する、前記（１）又は（２）に記載した抗体の部分配列からなる抗体：

であり、

前記のリンカーを有する化学療法剤が、式（ｘ）：

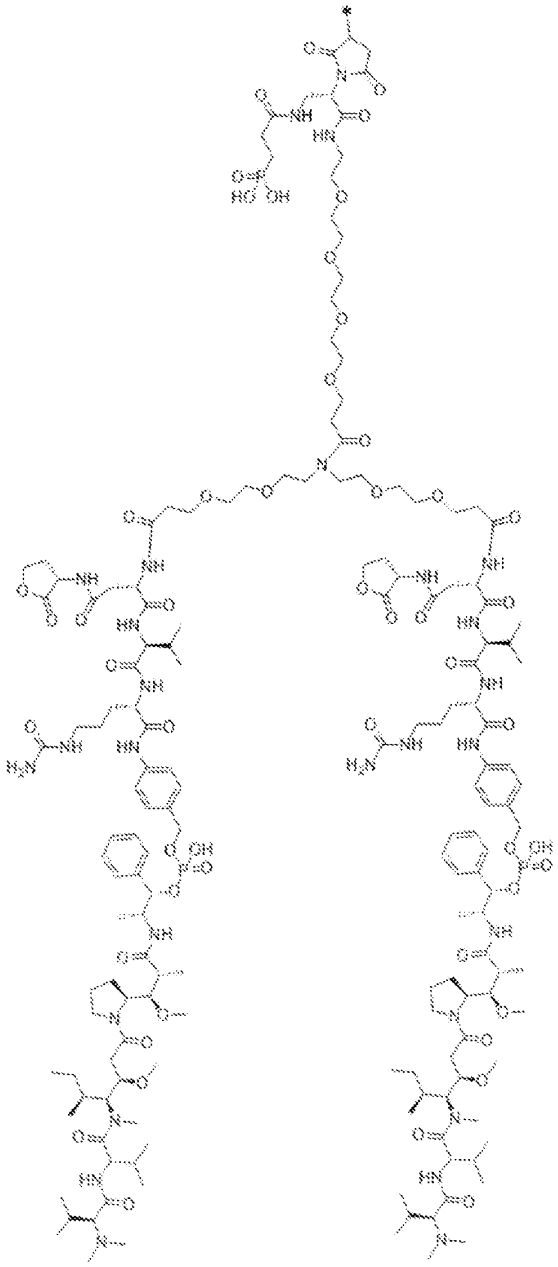
[化1]



（式中、＊が抗体との接続部分を示す。）

または式（ｙ）：

[化2]



（式中、＊が抗体との接続部分を示す。）

である抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物。

[請求項2] 前記前記抗ＣＤＨ３ヒト化抗体が、以下の何れかの抗体である、請求

項１に記載の抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物。

（１）配列番号５に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体

（２）配列番号７に記載のアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖とを有する抗ＣＤＨ３ヒト化抗体。

[請求項3] １分子の抗ＣＤＨ３ヒト化抗体に対して、平均で１～１０分子の、リンカーを有する化学療法剤が結合している、請求項１に記載の抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物。

[請求項4] 請求項１から３の何れか一項に記載の抗体・薬物コンジュゲート、その薬理上許容される塩、またはそれらの水和物を含む、ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患を治療するための医薬。

[請求項5] ＣＤＨ３の過剰発現によって特徴づけられる疾患が、腫瘍またはがんである、請求項４に記載の医薬。