

明 細 書

発明の名称：

抗CDH6抗体ーピロロベンゾジアゼピン誘導体コンジュゲート

技術分野

[0001] 本発明は、CDH6に結合し内在化作用を有する抗CDH6抗体とピロロベンゾジアゼピン誘導体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ー薬物コンジュゲートに関する。

背景技術

[0002] カドヘリン (C a d h e r i n) は、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にN末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、5個の細胞外ドメイン (e x t r a c e l l u l a r d o m a i n、ECドメイン) と1個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される1回膜貫通タンパク質である。クラシックカドヘリンはアミノ酸配列の相同性から、EーカドヘリンやNーカドヘリンに代表されるタイプIファミリーと、タイプIIファミリーに分類される。

[0003] カドヘリン6 (C a d h e r i n - 6、CDH6) は、タイプIIカドヘリンファミリーに分類される、790アミノ酸からなる1回膜貫通タンパク質であり、N末端側を細胞外、C末端側を細胞内に持つ。ヒトCDH6遺伝子は1995年に初めてクローニングされ (非特許文献1)、NM__004932、NP__004923 (NCBI) 等のアクセッション番号により参照可能である。

[0004] CDH6は発生期において脳や腎臓で特異的に発現しており、中枢神経系の回路形成 (非特許文献2、非特許文献3) や腎臓のネフロン発生時 (非特許文献4、非特許文献5) に重要な役割を担うことが報告されている。成人の正常組織では、CDH6の発現は腎尿細管や胆管上皮細胞などに限局され

ている。

[0005] 一方で、成人のいくつかの癌種において、腫瘍部で特異的にCDH6の発現が亢進することが知られており、ヒト腎細胞癌、特に腎淡明細胞癌では、CDH6発現と予後不良との相関や、腫瘍マーカーとしての利用可能性が報告されている（非特許文献6、非特許文献7）。ヒト卵巢癌でもCDH6の高発現が報告されている（非特許文献8）、ヒト甲状腺癌の上皮間葉変換と転移にCDH6が関与するとの報告もある（非特許文献9）。また、CDH6は、ヒト胆管癌およびヒト小細胞肺癌でも発現していることが報告されている（非特許文献12、13）。

[0006] がんは死亡原因の上位を占め、その罹患数は人口の高齢化と共に増加することが予想されているが、未だ治療ニーズは十分に満たされていない。従来の化学療法剤は、その選択性の低さから腫瘍細胞だけでなく正常細胞に対しても傷害性を持つことによる副作用や、十分な薬剤量を投与できないことで薬剤の効果を十分に得ることが出来ないことが問題となっている。このため近年では、がん細胞に特徴的な変異や高発現を示す分子、細胞のがん化に関与する特定の分子を標的としたより選択性の高い分子標的薬や抗体医薬の開発が行われている。

[0007] 抗体は血中安定性が高く、標的抗原に特異的に結合することから副作用の軽減が期待されており、がん細胞表面に高発現している分子に対する抗体医薬が多数開発されている。抗体の抗原特異的な結合能を利用した技術の一つとして、抗体-薬物コンジュゲート（Antibody-Drug Conjugate；ADC）が挙げられる。ADCは、がん細胞表面に発現している抗原に結合し、その結合によって抗原を細胞内に内在化できる抗体に、細胞傷害活性を有する薬物を結合させたものである。ADCは、がん細胞に効率的に薬物を送達できることによって、がん細胞内に薬物を蓄積させ、がん細胞を死滅させることが期待できる（非特許文献10、特許文献1及び2）。ADCとして例えば、抗CD30モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチンEを結合させたアドセトリス（商標）（ブレンツキシマブ ベド

チン) 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認可されている。また、抗HER2モノクローナル抗体にエムタンシンを結合させたカドサイラ(商標)(トラスツズマブ エムタンシン) がHER2陽性の進行、再発乳癌の治療に用いられている。

[0008] 抗腫瘍薬としてのADCに適した標的抗原の特徴としては、がん細胞表面で特異的に高発現し、正常細胞では低発現又は発現していないこと、細胞内に内在化できること、抗原が細胞表面から分泌されないことなどが挙げられる。また、ADCに適した抗体の重要な特徴としては、標的となる抗原に特異的に結合することに加えて、高い内在化能を有することが挙げられる。抗体の内在化能は標的抗原と抗体の両方の性質に依存するものであり、標的の分子構造から内在化に適した抗原結合部位を推定したり、抗体の結合強度や物性等から容易に内在化能の高い抗体を推測したりすることは困難である。このため、標的抗原に対して高い内在化能を有する抗体を取得することは、有効性の高いADCを開発する上で重要な課題となっている(非特許文献1)。

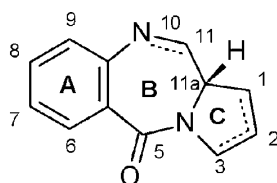
[0009] CDH6を標的としたADCとしては、CDH6のECドメイン5(EC5)に特異的に結合する抗CDH6抗体にDM4を結合させたADCが知られている(特許文献3)。

[0010] ADCに結合させる薬物として有用なものの一つにピロロベンゾジアゼピン(PBD)が挙げられる。PBDはDNA小溝のPuG Pu配列などに結合することによって細胞毒性を示す。天然由来のPBDであるanthramycinは1965年に初めて発見され、それ以降様々な天然由来、またその類縁体のPBDが発見された(非特許文献14~17)。

[0011] PBDの一般的な構造式は下式

[0012]

[化1]



[0013] で示される。PBDはそれぞれA，C環部において置換基の数、種類、部位において異なり、また、それぞれB，C環部の不飽和度が異なるものが知られている。

[0014] PBDは二量体構造にすることにより、飛躍的に細胞毒性が向上することが知られており（非特許文献18、19）、二量体PBDをADC化したものも種々報告されている（特許文献4～16）。しかしながら、C2位においてスピロ環を有するPBD又はそのADC体は知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0015] 特許文献1：WO2014/057687
特許文献2：US2016/0297890
特許文献3：WO2016/024195
特許文献4：WO2013/173496
特許文献5：WO2014/130879
特許文献6：WO2017/004330
特許文献7：WO2017/004025
特許文献8：WO2017/020972
特許文献9：WO2016/036804
特許文献10：WO2015/095124
特許文献11：WO2015/052322
特許文献12：WO2015/052534
特許文献13：WO2016/115191
特許文献14：WO2015/052321

特許文献15: WO 2015/031693

特許文献16: WO 2011/130613

非特許文献

[0016] 非特許文献1: Shimoyama Y, et al., Cancer Research, 2206-2211, 55, May 15, 1995

非特許文献2: Inoue T, et al., Developmental Biology, 183-194, 1997

非特許文献3: Osterhout J A, et al., Neuron, 632-639, 71, Aug 25, 2011

非特許文献4: Cho E A, et al., Development, 803-812, 125, 1998

非特許文献5: Mah S P, et al., Developmental Biology, 38-53, 223, 2000

非特許文献6: Paul R, et al., Cancer Research, 2741-2748, July 1, 57, 1997

非特許文献7: Shimazui T, et al., Cancer, 963-968, 101 (5), Sep. 1, 2004

非特許文献8: Koebel M, et al., PLoS Medicine, 1749-1760, 5 (12), e232, Dec. 2008

非特許文献9: Gugnoni M, et al., Oncogene, 667-677, 36, 2017

非特許文献10: Polakis P., Pharmacological Reviews, 3-19, 68, 2016

非特許文献11: Peters C, et al., Bioscience Reports, 1-20, 35, 2015

非特許文献12: Goepfert B, et al., Epigenetics, 780-790, 11 (11), 2016

非特許文献13: Yokoi S, et al., American Jo

urnal of Pathology, 207-216, 161, 1, 2002

非特許文献14: Julia Mantaj, et al., Angewandte Chemie International Edition 2016, 55, 2-29

非特許文献15: Dyeison Antonow, et al., Chemical Reviews 2010, 111, 2815-2864

非特許文献16: In Antibiotics III. Springer Verlag, New York, pp. 3-11

非特許文献17: Accounts of Chemical Research 1986, 19, 230

非特許文献18: Journal of the American Chemical Society 1992, 114, 4939

非特許文献19: Journal of Organic Chemistry 1996, 61, 8141

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0017] 本発明の課題は、CDH6に対して特異的に結合する高い内在化活性を有する抗体、該抗体を含む高い抗腫瘍活性を有する抗体-薬物コンジュゲート、該抗体-薬物コンジュゲートを用いた腫瘍に対する治療効果を有する医薬品、及び、当該抗体、抗体-薬物コンジュゲート又は医薬品を用いた腫瘍の治療方法等を提供することである。

課題を解決するための手段

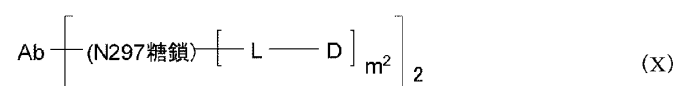
- [0018] 本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討したところ、驚くべきことにCDH6の細胞外ドメイン3（本明細書中、EC3とも称する）に特異的に結合する抗体が、CDH6を発現する細胞において極めて高い内在化活性を有しADC用抗体として有用であることを見出した。また、本発明者らは、当該抗CDH6抗体と新規PBD誘導体を結合させた抗CDH6抗体

ー薬物コンジュゲートを取得することに成功し、当該抗CDH6抗体ー薬物コンジュゲートが強い抗腫瘍活性を示すことを見出した。

[0019] 本願発明は、以下に関するものである。

[1] 次式(X)：

[0020] [化2]



[0021] (式中、 m^2 は1又は2の整数を示し、

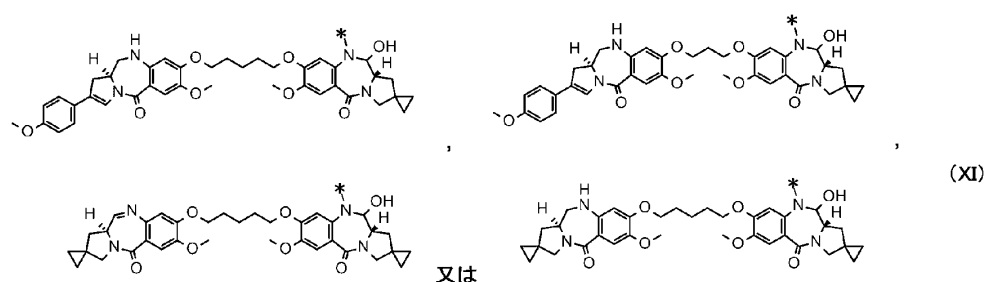
Abは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、IgG抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

Lは、AbのN297に結合する糖鎖(N297糖鎖)とDを連結するリンカーであり、

N297糖鎖は、リモデリングされていてもよい糖鎖を示し、

Dは、以下：

[0022] [化3]



[0023] から選択されるいずれか1つであり、式中、* (アスタリスク) はLと結合していることを示す)

で示される抗体ー薬物コンジュゲート。

[2] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列への結合に対して、以下の(1)～(8)：

- (1) 配列番号23の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号26の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- (2) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号39の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- (3) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- (4) 配列番号35の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- (5) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号47の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- (6) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、
- (7) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、及び
- (8) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、からなる群から選択される抗体のうち少なくともいずれか1つと競合阻害活性を示す、

[1] に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[3] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(4)：

- (1) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号18に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、
- (2) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミ

ノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号30に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

(3) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び

(4) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

からなる群から選択されるCDRL1、CDRL2及びCDRL3、及び、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む、

[1] 又は [2] のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[4] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(4)：

(1) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(2) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(3) (1) 又は (2) のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び

(4) (1)～(3) のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域、並びに、以下の(5)～(11)：

(5) 配列番号41に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(6) 配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(7) 配列番号49に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(8) 配列番号55に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(9) 配列番号60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(10) (5)～(9)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び
(11) (5)～(10)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列
からなる群から選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域、
を含む、[1]～[3]のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート
。

[5] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(6)：

(1) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号41に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(2) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(3) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(4) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号49に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
(5) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号55に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は
(6) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、
を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート

。

〔６〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の（１）～（７）：

（１）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号３９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（２）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（３）配列番号３５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（４）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（５）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６５の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（６）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は

（７）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

のいずれかを有する、〔１〕～〔５〕のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔７〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号３９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、〔６〕に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔８〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、〔６〕に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔９〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号３５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のア

ミノ酸配列からなる重鎖を有する、〔6〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔10〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号47の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、〔6〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔11〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する〔6〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔12〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する〔6〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔13〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する〔6〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔14〕Lが、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-*$ で示され、

式中、*は前記DのN10'位の窒素原子と結合していることを示し、

Bは、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基又は2,5-チエニル基であり、

Lpは、以下：

$-GGVA-$ 、 $-GG-(D)-VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ 、 $-GGPI-$ 、 $-GGVCit-$ 、 $-GGVK-$ 、及び、 $-GGPL-$ 、
からなる群から選択されるいずれか1つを示し、

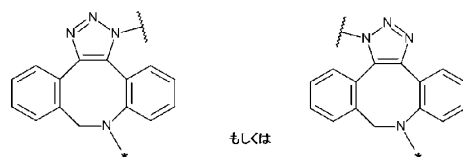
Laは、以下：

$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2-$
 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2-$
 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、及び、
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、

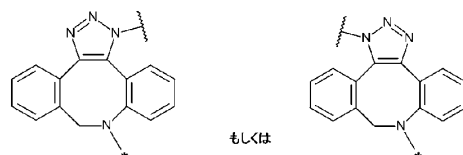
からなる群から選択されるいずれか1つを示し、並びに、

L bは、次式：

[0024] [化4]

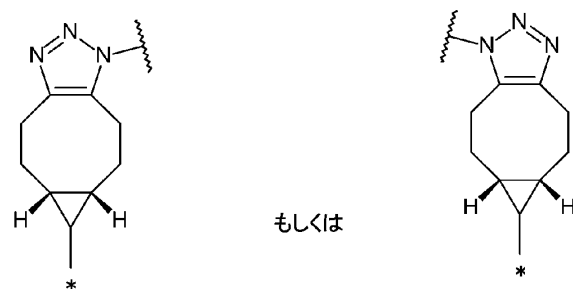


[0025] [化5]



[0026] 、又は、

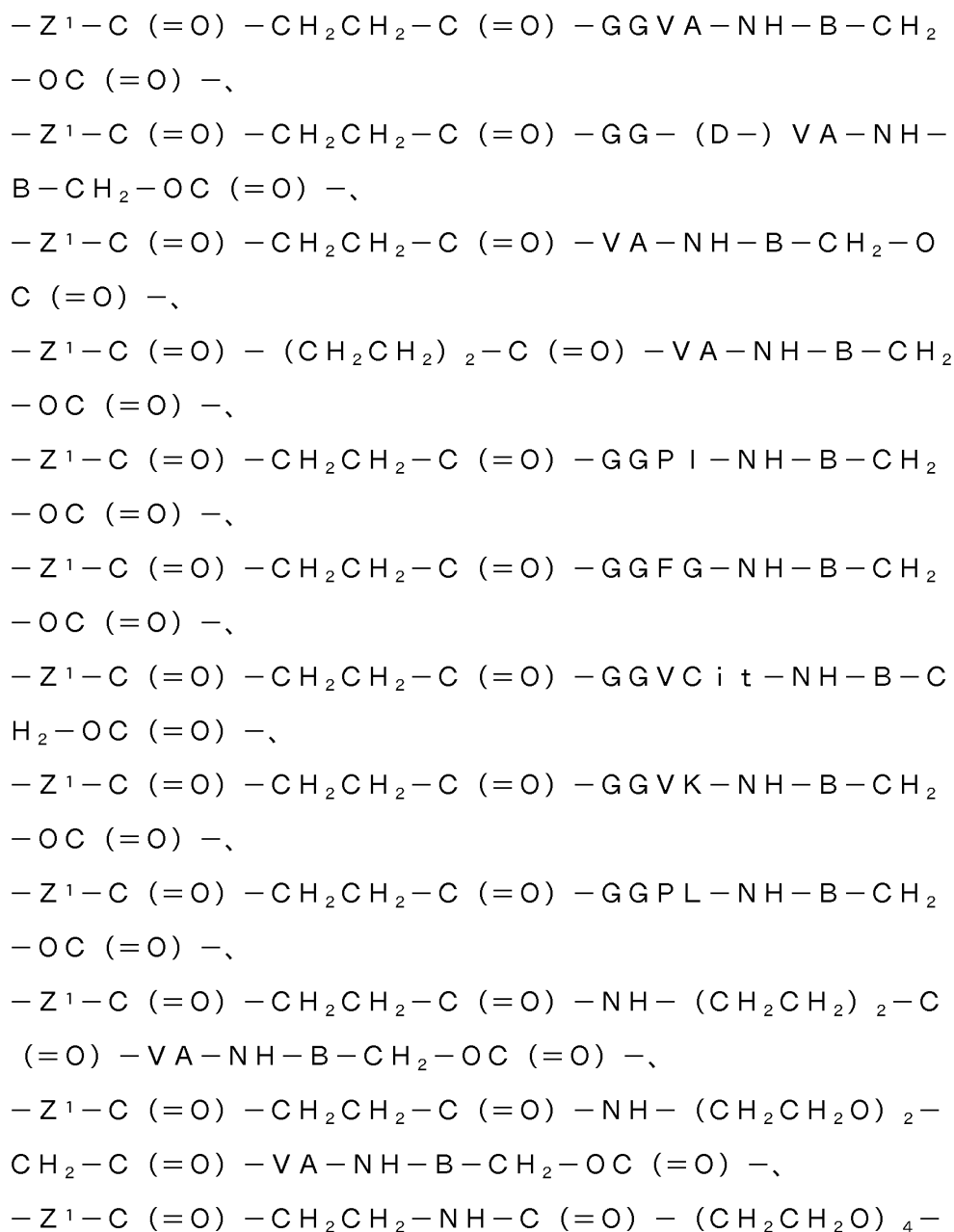
[0027] [化6]



[0028] (ここで、上記で示されるL bの構造式において、*はL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)で示される、

[1] ~ [13] のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

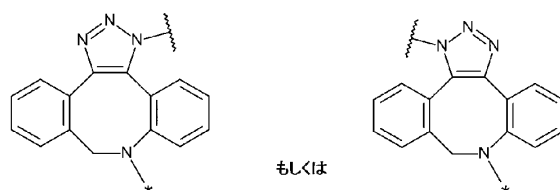
[15] Lが、以下：



$\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^2-\text{OC}(=\text{O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、及び
 $-\text{Z}^3-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$
 からなる群から選択されるいずれか1つを示し、

ここで、 Z^1 は、以下の構造式：

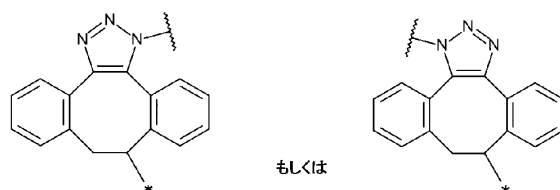
[0029] [化7]



[0030] を示し、

Z^2 は、以下の構造式：

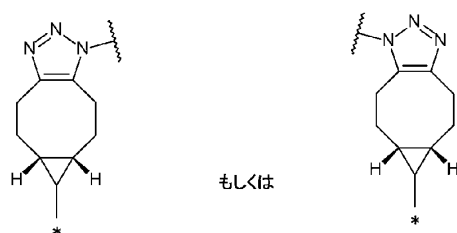
[0031] [化8]



[0032] を示し、

Z^3 は、以下の構造式：

[0033] [化9]



[0034] を示し、

ここで、 Z^1 、 Z^2 及び Z^3 の構造式において、*は Z^1 、 Z^2 又は Z^3 に隣接

するC(=O)、O又はCH₂と結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示し、並びに、

Bは、1, 4-フェニル基を示す、

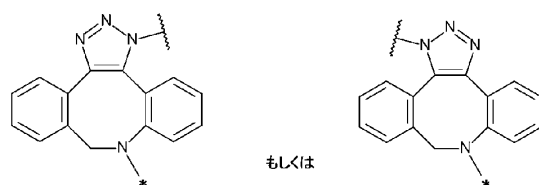
[1] ~ [14] のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[16] Lが、以下：

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-$
 $-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-O$
 $C(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-$
 $-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-$
 $-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C$
 $(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-$
 $CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、及び
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-$
 $CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 からなる群から選択されるいずれか1つを示し、

ここで、Bは1, 4-フェニル基であり、Z¹は以下の構造式：

[0035] [化10]



[0036] を示し、

ここで、Z¹の構造式において、*はZ¹に隣接するC(=O)と結合して

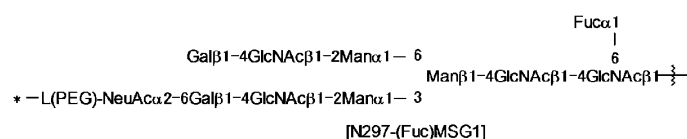
いることを示し、波線はA bのN 2 9 7に結合する糖鎖（N 2 9 7糖鎖）又はそのリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、[1]～[15]のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[17] 抗体が、I g G 1、I g G 2又はI g G 4である、[1]～[16]のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

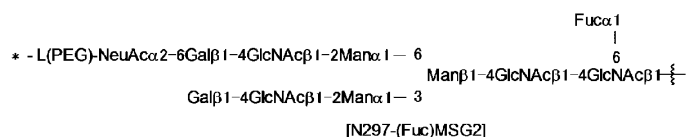
[18] N 2 9 7糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、[1]～[17]のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[19] N 2 9 7糖鎖が、次式で示される構造を有するN 2 9 7－（F u c）MSG 1、N 2 9 7－（F u c）MSG 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7－（F u c）SGである、[1]～[18]のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

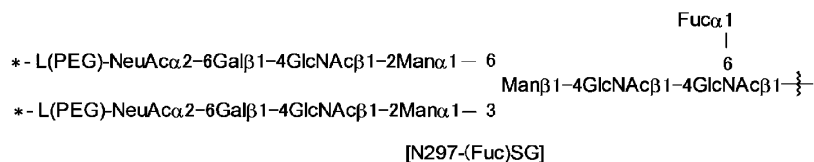
[0037] [化11]



[0038] [化12]



[0039] [化13]



[0040] 式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

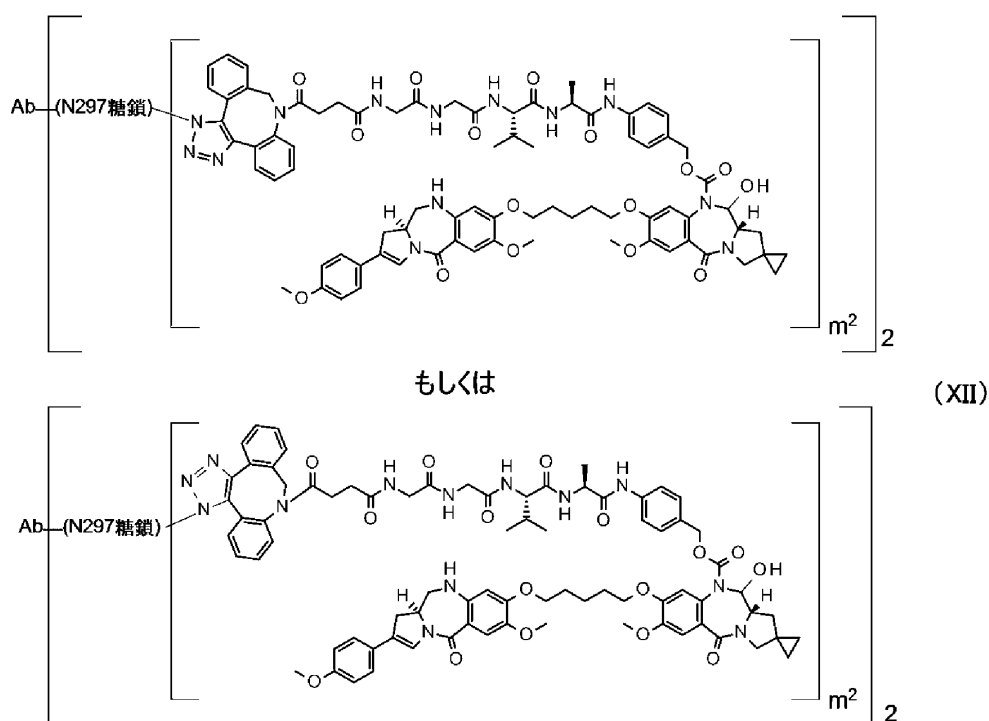
N 2 9 7糖鎖中の*－L（PEG）－は、*－（CH₂CH₂－O）_n－CH₂CH₂－NH－を示し、

ここで、 n^5 は2～5の整数であることを示し、右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側又は／及び1-6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す。

[20] n^5 が3である、[19]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[21] 次の式(XII)：

[0041] [化14]



[0042] で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

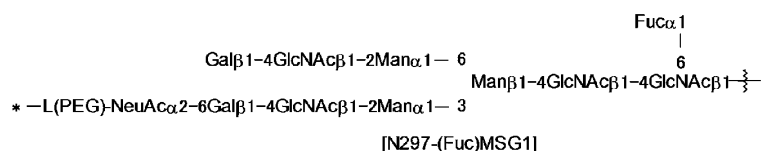
上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

Abは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、IgG抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

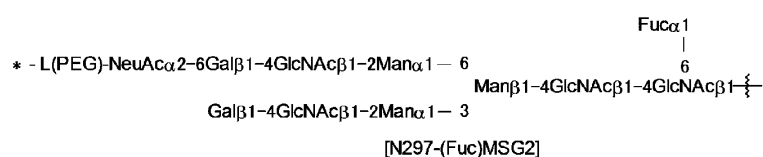
AbのN297糖鎖は次式で示される構造を有するN297-(Fuc)

MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGのいずれか1つであることを示し、

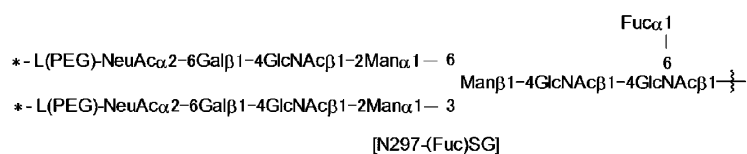
[0043] [化15]



[0044] [化16]



[0045] [化17]



[0046] 式中、波線は抗体のAsn297(N297)に結合していることを示し、

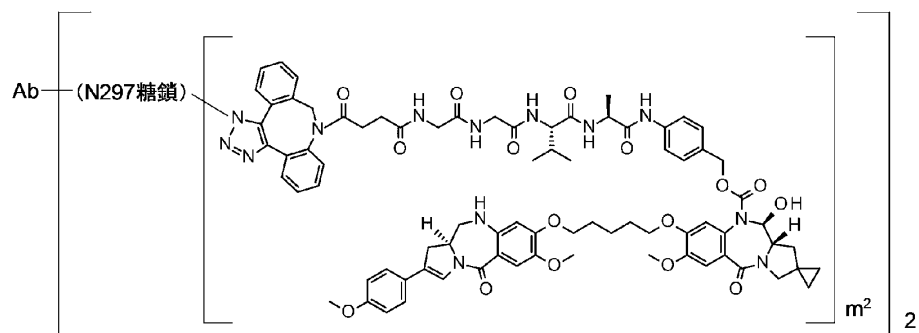
N297糖鎖中の*—L(PEG)—は、*—(CH₂CH₂—O)₃—CH₂CH₂—NH—であることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖のβ—Manの分岐鎖の1—3鎖側又は／及び1—6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す、抗体—薬物コンジュゲート。

[22] 式(XII)で表される化合物が、次の式(XII')：

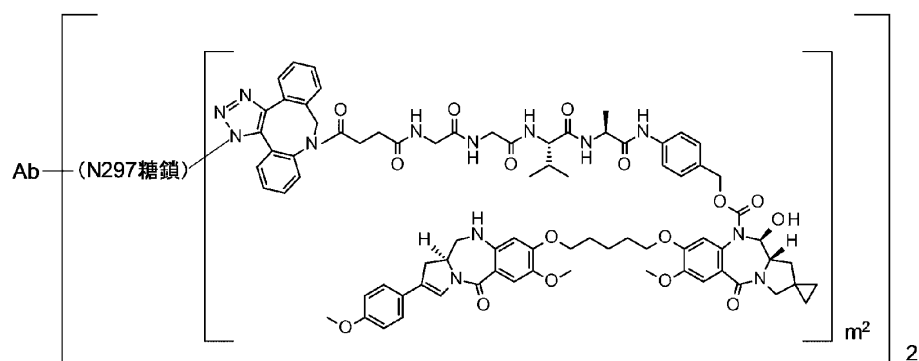
[0047]

[化18]



もしくは

(XII')

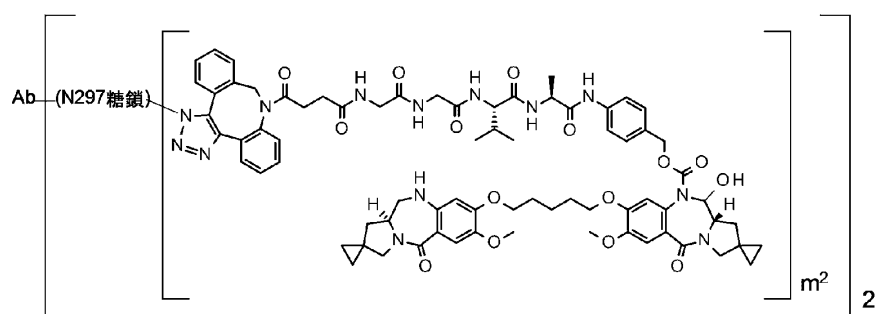


[0048] で表される、[2 1] に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[2 3] 次の式 (X I I I) :

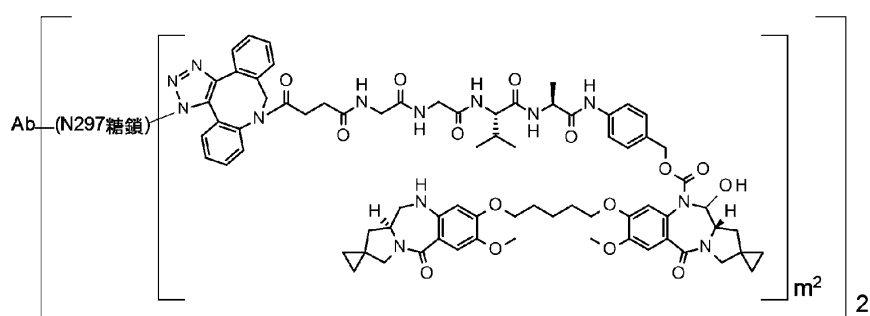
[0049]

[化19]



もしくは

(XIII)



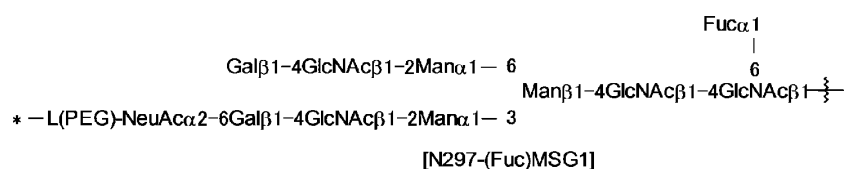
[0050] で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

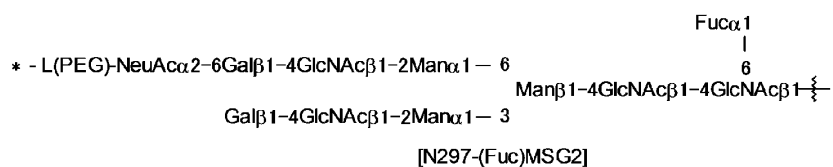
A bのN 2 9 7糖鎖は次式で示される構造を有するN 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7 - (F u c) S Gのいずれか1つであることを示し、

[0051] [化20]

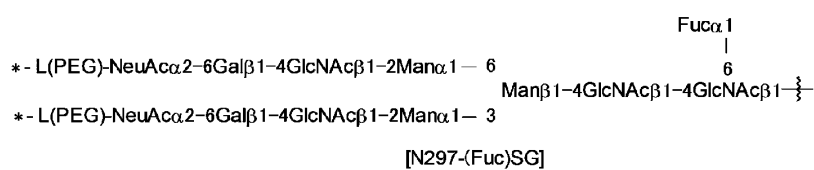


[0052]

[化21]



[0053] [化22]



[0054] 式中、波線は抗体のAsn297(N297)に結合していることを示し

、

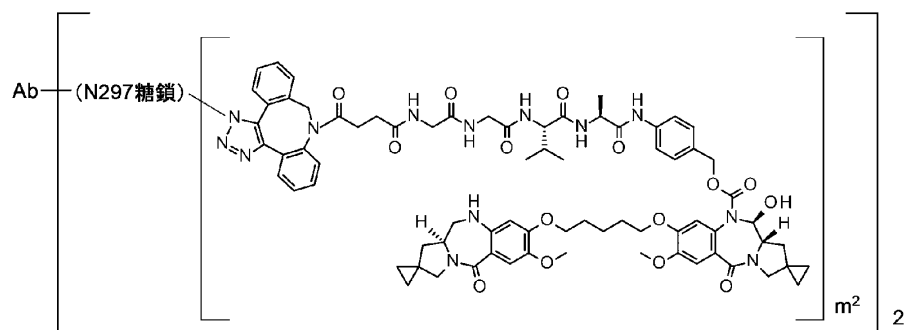
N297糖鎖中の*—L(PEG)—は、*—(CH₂CH₂—O)₃—CH₂CH₂—NH—であることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖のβ—Manの分岐鎖の1—3鎖側又は／及び1—6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す、抗体—薬物コンジュゲート。

[24]式(XIII)で表される化合物が、次の式(XIII')：

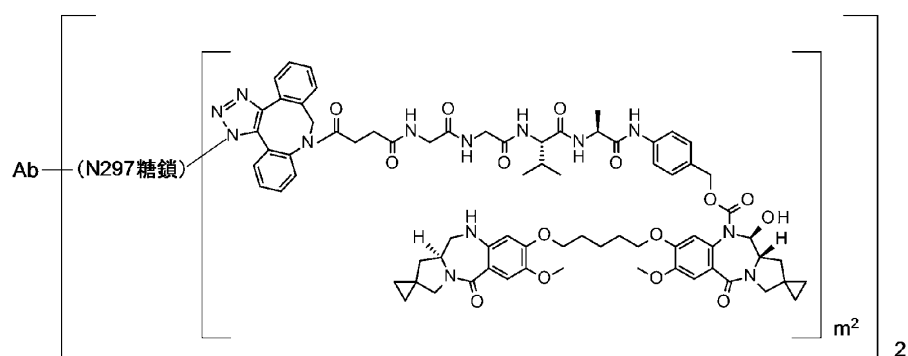
[0055]

[化23]



もしくは

(XIII')

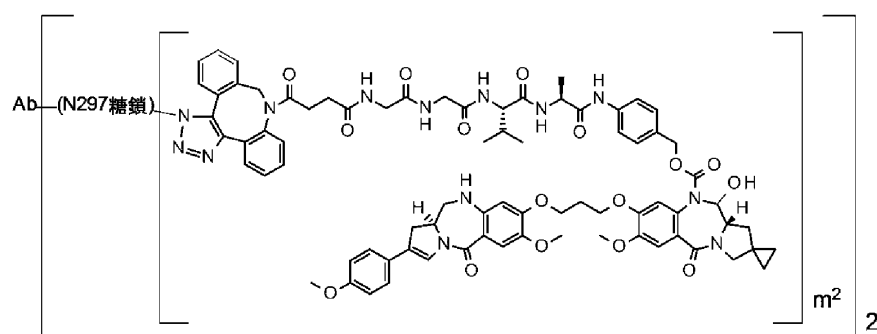


[0056] で表される、[2 3] に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[2 5] 次の式 (X I V) :

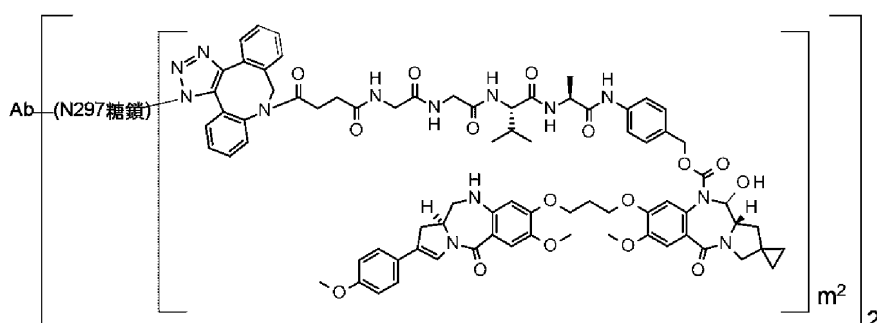
[0057]

[化24]



もしくは

(XIV)



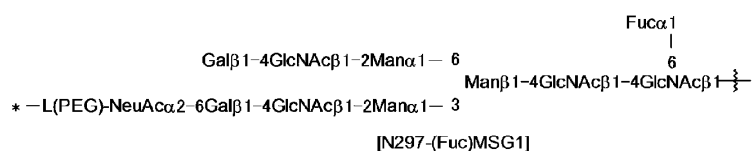
[0058] で表される抗体－薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

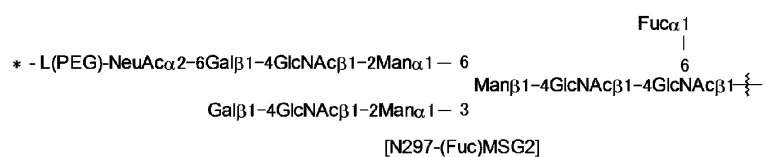
A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

A bのN 2 9 7糖鎖は次式で示される構造を有するN 2 9 7－(F u c)MSG 1、N 2 9 7－(F u c)MSG 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7－(F u c)SGのいずれか1つであることを示し、

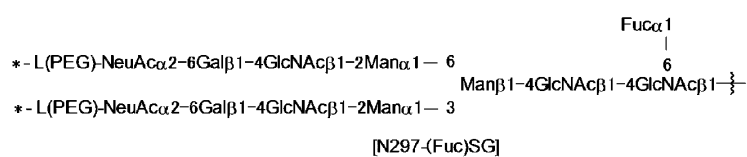
[0059] [化25]



[0060] [化26]



[0061] [化27]



[0062] 式中、波線は抗体のAsn297(N297)に結合していることを示し

、

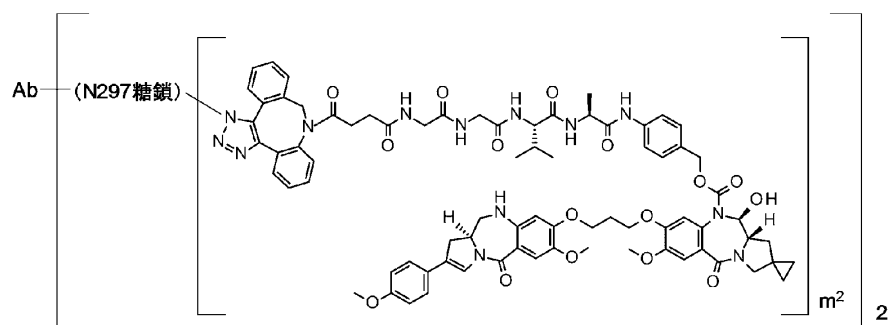
N297糖鎖中の*—L(PEG)—は、*—(CH₂CH₂—O)₃—CH₂CH₂—NH—であることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖のβ—Manの分岐鎖の1—3鎖側又は／及び1—6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す、抗体—薬物コンジュゲート。

[26]式(XIV)で表される化合物が、次の式(XIV')：

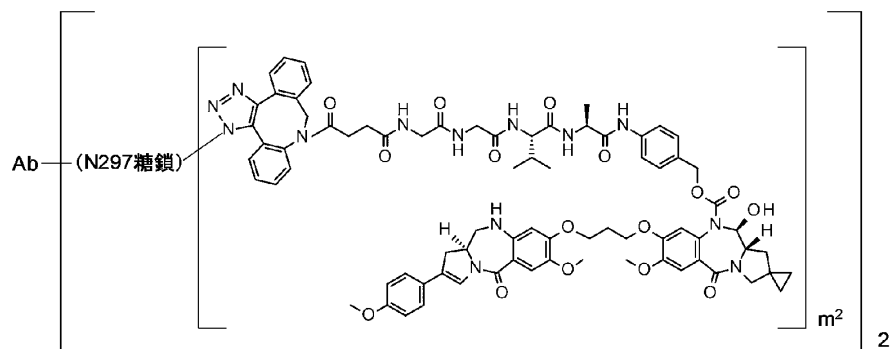
[0063]

[化28]



もしくは

(XIV')

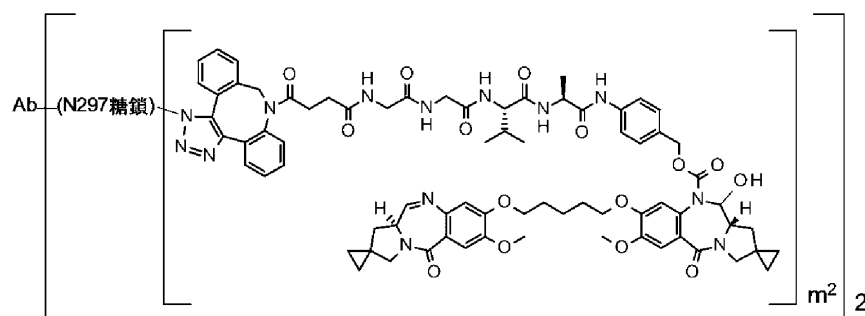


[0064] で表される、[25] に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[27] 次の式(XV)：

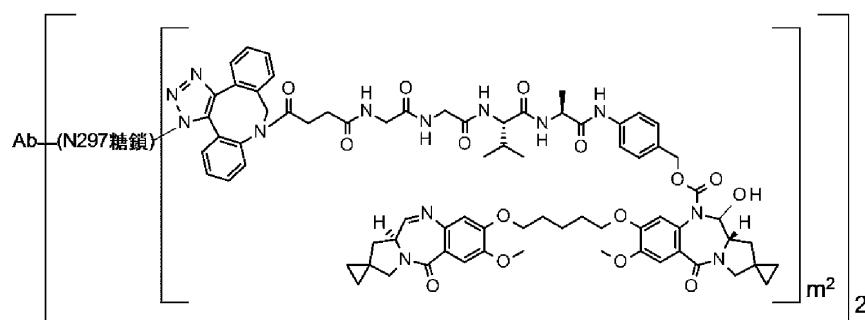
[0065]

[化29]



もしくは

(XV)



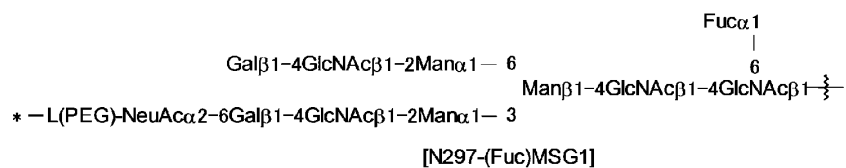
[0066] で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

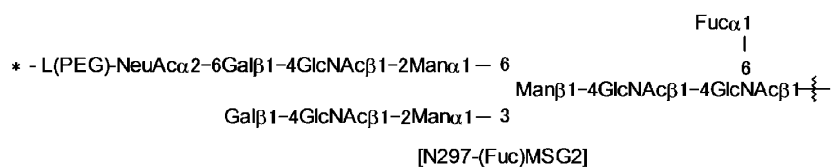
A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

A bのN 2 9 7糖鎖は次式で示される構造を有するN 2 9 7-(F u c)MSG 1、N 2 9 7-(F u c)MSG 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7-(F u c)SGのいずれか1つであることを示し、

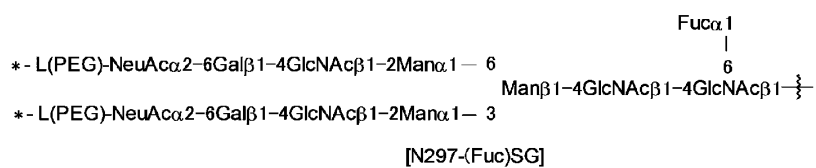
[0067] [化30]



[0068] [化31]



[0069] [化32]



[0070] 式中、波線は抗体のAsn297(N297)に結合していることを示し

、

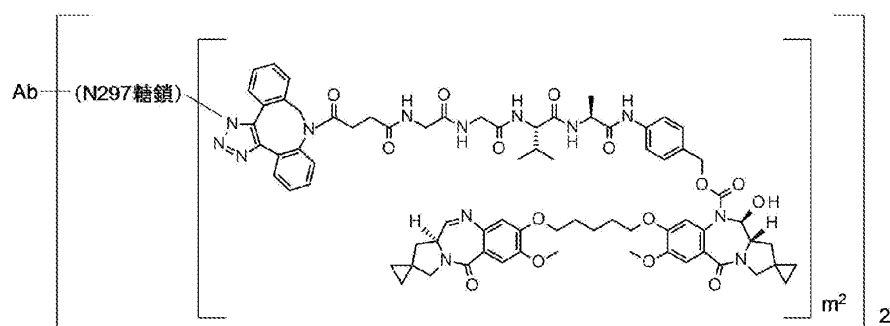
N297糖鎖中の*—L(PEG)—は、*—(CH₂CH₂—O)₃—CH₂CH₂—NH—であることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖のβ—Manの分岐鎖の1—3鎖側又は／及び1—6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す、抗体—薬物コンジュゲート。

[28] 式(XV)で表される化合物が、次の式(XV')：

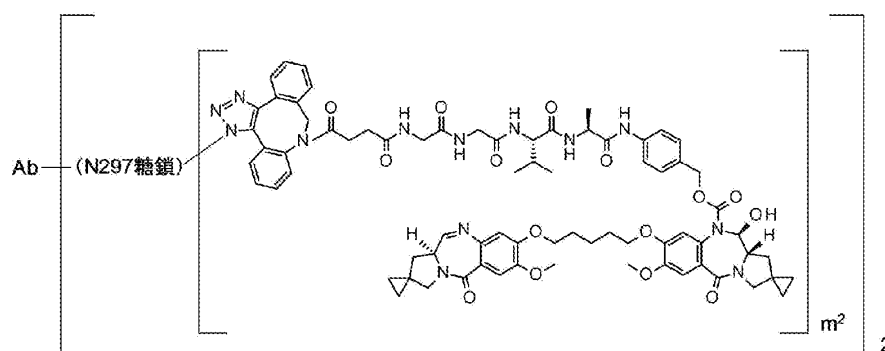
[0071]

[化33]



もしくは

(XV')



[0072] で表される、[2 7] に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[2 9] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の (1) ～ (4) :

(1) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3、及び、配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3、

(2) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3、及び、配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3、

(3) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び

(4) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

からなる群から選択されるCDRL1、CDRL2及びCDRL3、及び、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む、

[21]～[28]のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[30] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(6)：

(1) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号41に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(2) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(3) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(4) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号49に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(5) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号55に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は

(6) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、

を含む、[21]～[29]のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲ

ート。

〔31〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の（１）～（７）：

（１）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号３９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（２）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（３）配列番号３５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（４）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（５）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６５の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

（６）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６７の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、又は

（７）配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号６９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

のいずれかを有する、〔２１〕～〔３０〕のいずれか１項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔３２〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号３９の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、〔３１〕に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔３３〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号３１の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、〔３１〕に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔３４〕前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号３５の２１～２３３番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号４３の２０～４７１番目の

アミノ酸配列からなる重鎖を有する、[31]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[35] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号47の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、[31]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[36] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、[31]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[37] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、[31]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[38] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する[31]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[39] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1～3である、[1]～[38]のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[0073] [40] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、3～5である、[1]～[38]のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[41] 重鎖がN-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N末のプロセッシング、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、N末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化及びカルボキシル末端において1つ又は2つのアミノ酸が欠失した重鎖か

らなる群より選択される 1 又は 2 以上の修飾を含む抗体である、[1]～[40]のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[42] 重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失した、[1]～[41]のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[43] 以下の工程：

i) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、IgG 抗体又は当該抗体の機能性断片を製造する工程、

ii) 工程 i) で得られた抗体を加水分解酵素で処理し、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を製造する工程、及び、

iii) -1 MSG(9) 又は SG(10) のシアル酸の 2 位のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有する PEG リンカーを導入し、還元末端をオキサゾリン化して得た糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で (Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を反応させる工程、又は、

iii) -2 α -アミノ基が保護されていてもよい (MSG-)Asn 又は (SG-)Asn のシアル酸の 2 位のカルボン酸のカルボニル基及び前記 Asn のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有する PEG リンカーを導入し、加水分解酵素を作用させた後、還元末端をオキサゾリン化して得た糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で (Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を反応させる工程、

を含む、糖鎖リモデリング抗体の製造方法。

[44] [43] に記載の方法により得られた糖鎖リモデリング抗体とドラッグリンカーを反応させる工程を含む、[1]～[42]のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

[45] [44] に記載の方法で製造された、[1]～[42]のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[0074] [46] 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L1、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L2 及び配列番号 14 に記載のア

ミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖可変領域、及び、配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖可変領域を含む、抗体又はその機能性断片。

[47] 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖可変領域、及び、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖可変領域を含む、抗体又はその機能性断片。

[48] 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号55に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、[46]に記載の抗体又はその機能性断片。

[49] 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、[47]に記載の抗体又はその機能性断片。

[50] 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、[46]又は[48]に記載の抗体又はその機能性断片。

[51] 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、[47]又は[49]に記載の抗体又はその機能性断片。

[52] 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、抗体又はその機能性断片。

[53] [46]～[52]のいずれか1項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[0075] [54] [53]に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

〔55〕〔54〕に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

〔56〕〔55〕に記載の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、〔46〕～〔52〕に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の製造方法。

〔57〕〔56〕に記載の製造方法により得られる、抗体又は該抗体の機能性断片。

〔58〕〔1〕～〔42〕若しくは〔45〕のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、又は、〔46〕～〔52〕若しくは〔57〕のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片を含む、医薬組成物。

〔59〕抗腫瘍薬である、〔58〕に記載の医薬組成物。

〔60〕腫瘍がCDH6が発現している腫瘍である、〔59〕に記載の医薬組成物。

〔61〕腫瘍が腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫である、〔60〕に記載の医薬組成物。

〔62〕〔1〕～〔42〕若しくは〔45〕のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、〔46〕～〔52〕若しくは〔57〕のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片、又は、〔58〕～〔61〕のいずれか1項に記載の医薬組成物を個体に投与する工程を含む、腫瘍の治療方法。

〔63〕腫瘍がCDH6が発現している腫瘍である、〔62〕に記載の治療方法。

〔64〕腫瘍が、腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫である、〔62〕又は〔63〕に記載の治療方法。

〔65〕〔1〕～〔42〕若しくは〔45〕のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、〔46〕～〔52〕若しくは〔57〕のいずれか1項

に記載の抗体又は該抗体の機能性断片、又は、[58]～[61]のいずれか1項に記載の医薬組成物と少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与する工程を含む、[62]～[64]のいずれか1項に記載の治療方法。

発明の効果

[0076] 本発明の抗CDH6抗体は、CDH6のECドメイン3（EC3）を特異的に認識し、高い内在化活性を有することを特徴とする。本発明の抗CDH6抗体と本発明の新規PBD誘導体をリンカーを介して結合させた抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、CDH6を発現するがん細胞を有する患者に投与することによって、優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することが期待できる。即ち、本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、抗腫瘍剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0077] [図1]図1は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体rG019又は陰性コントロール抗体RatIgG2bの、コントロール細胞（網掛け）又はhCDH6導入293T細胞（白抜き実線）に対する結合を調べたフローサイトメトリの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図2-1]（1）は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体rG019又は陰性コントロール抗体RatIgG2bの、コントロール細胞（網掛け）又は全長hCDH6導入293細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。（2）は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体rG019又は陰性コントロール抗体RatIgG2bの、コントロール細胞（網掛け）又はEC1欠失hCDH6導入293細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。（3）は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体rG019又は陰性コントロール抗体RatIgG2bの、コントロール細胞（網掛け）又はEC2欠失hCDH6導入293細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。（1）～（3）の各図において、横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を

示す。

[図2-2] (4) は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体 r G 0 1 9 又は陰性コントロール抗体 R a t I g G 2 b の、コントロール細胞（網掛け）又は E C 3 欠失 h C D H 6 導入 2 9 3 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。

(5) は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体 r G 0 1 9 又は陰性コントロール抗体 R a t I g G 2 b の、コントロール細胞（網掛け）又は E C 4 欠失 h C D H 6 導入 2 9 3 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。(6) は、ラット抗CDH6モノクローナル抗体 r G 0 1 9 又は陰性コントロール抗体 R a t I g G 2 b の、コントロール細胞（網掛け）又は E C 5 欠失 h C D H 6 導入 2 9 3 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。(4) ~ (6) に各図において、横軸は抗体結合量を表す F I T C の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図3] 図3 は、5 種類のヒト腫瘍細胞株（ヒト卵巣腫瘍細胞株 N I H : O V C A R - 3、P A - 1、O V - 9 0、及びヒト腎細胞腫瘍細胞株 7 8 6 - O、C a k i - 1）の細胞膜表面でのCDH6の発現を評価したフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表す F I T C の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは陰性コントロール m I g G 1 で染色した場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは抗ヒトCDH6抗体で染色した場合を示す。

[図4] 図4 は、ヒトキメラ抗CDH6抗体 c h G 0 1 9 のヒトCDH6及びサルCDH6に対する結合を示す。横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量を M e a n F l u o r e s c e n t I n t e n s i t y（平均蛍光強度）で示す。

[図5-1] 図5-1 は、ヒト化 h G 0 1 9 抗体4種（H 0 1 L 0 2、H 0 2 L 0 2、H 0 2 L 0 3 及び H 0 4 L 0 2）、抗CDH6抗体 N O V 0 7 1 2 又は陰性コントロール抗体 h I g G 1 の、コントロール細胞（網掛け）又は全長 h C D H 6 導入 2 9 3 α 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表す A P C の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図5-2]図5-2は、ヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712又は陰性コントロール抗体hIgG1の、コントロール細胞（網掛け）又はEC1欠失hCDH6導入293 α 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図5-3]図5-3は、ヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712又は陰性コントロール抗体hIgG1の、コントロール細胞（網掛け）又はEC2欠失hCDH6導入293 α 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図5-4]図5-4は、ヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712又は陰性コントロール抗体hIgG1の、コントロール細胞（網掛け）又はEC3欠失hCDH6導入293 α 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図5-5]図5-5は、ヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712又は陰性コントロールのhIgG1の、コントロール細胞（網掛け）又はEC4欠失hCDH6導入293 α 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図5-6]図5-6は、ヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712又は陰性コントロールのhIgG1の、コントロール細胞（網掛け）又はEC5欠失hCDH6導入293 α 細胞（白抜き実線）に対する結合性を示す。横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図6]図6は、786-O/hCDH6安定発現細胞株（白抜き実線）及び親細胞株786-O（網掛け）におけるヒトCDH6の発現を調べたフローサイトメトリーの結果を示す。横軸は抗体結合量を表すAlexa Fluor

r 647の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。

[図7]図7は、ラベル化NOV0712（上段）又はラベル化H01L02（下段）を用いた、ラベル化していないヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712又は陰性コントロールのhIgG1との結合競合アッセイを示す。横軸はラベル化していない抗体の添加時の終濃度を示し、縦軸は結合量をMean Fluorescent Intensity（平均蛍光強度）で示す。

[図8]図8は、ヒト化hG019抗体4種（H01L02、H02L02、H02L03及びH04L02）、抗CDH6抗体NOV0712及び陰性コントロール抗体の内在化活性を、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトIgG試薬Hum-ZAP又は陰性コントロールとして毒素を結合していないF(ab')₂ Fragment Goat Anti-human IgG, Fc(gamma) Fragment Specificを用いて、NIH:OVCAR-3、786-O又はPA-1において評価した結果を示す。Hum-ZAPの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を100%とした相対生存率として算出された細胞生存率(%)を示す。

[図9]図9は、抗LPS抗体-PBD(ADC11)、H01L02-PBD(ADC1)、H01L02A-PBD(ADC5)、H11L02A-PBD(ADC7)、又はH31L02A-PBD(ADC6)の、CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株NIH:OVCAR-3、OV-90、PA-1又はCDH6陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株786-Oに対するIC₅₀(50%抑制濃度)(nM)を示す。

[図10]図10は、H01L02-PBD(ADC1)、NOV0712-DM4又は抗LPS抗体-PBD(ADC11)のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株OV-90を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範

図は標準誤差（SE）値を示す。

[図11]図11は、H01L02-PBD（ADC1）、NOV0712-DM4、抗LPS抗体-PBD（ADC11）のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株Caki-1を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は標準誤差（SE）値を示す。

[図12]図12は、H01L02-PBD（ADC1）、H01L02A-PBD（ADC5）、H31L02A-PBD（ADC6）、抗LPS抗体-PBD（ADC11）のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株NIH：OVCA-3を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[図13]図13は、H01L02-PBD（ADC1）、H01L02A-PBD（ADC5）、H31L02A-PBD（ADC6）、又はH11L02A-PBD（ADC7）のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株OV-90を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[図14]図14は、H01L02A-PBD（ADC5）、H31L02A-PBD（ADC6）又は抗LPS抗体-PBD（ADC11）のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株PA-1を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[図15]図15は、H01L02A-PBD（ADC5）、H31L02A-PBD（ADC6）、又は抗LPS抗体-PBD（ADC11）のin vivo抗腫瘍効果を示す。CDH6陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株786-Oを免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

発明を実施するための形態

- [0078] 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、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。
- [0079] 本明細書中、「がん」、「癌」及び「腫瘍」は同じ意味に用いられる。
- [0080] 本明細書中、「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。
- [0081] 本明細書中、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」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。本明細書中、「ポリヌクレオチド」と「ヌクレオチド」は、特に指定されない限り、交換可能に使用され得る。
- [0082] 本明細書中、「ポリペプチド」と「タンパク質」は交換可能に使用され得る。
- [0083] 本明細書中、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含む。
- [0084] 本明細書中、「CDH6」は、CDH6タンパク質と同じ意味で使用され得る。本明細書中、ヒトCDH6を「hCDH6」と記載する場合がある。
- [0085] 本明細書中、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。
- [0086] 本明細書中、「細胞内で毒性を発揮する」とは、何らかの形で、細胞内で毒性を示すことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下、細胞増殖因子の作用の抑制などあらゆる細胞の構造や機能、代謝に影響をもたらすことをいう。
- [0087] 本発明において、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、diabody、線状抗体及び抗体

断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、 $F(a b')_2$ を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片である $F a b'$ も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0088] 本発明の機能性断片は、 $I g G$ 重鎖の $F c$ 領域においてよく保存された N 結合型糖鎖による修飾を受けるアスパラギン($A s n 297$ もしくは $N 297$)及びその周辺のアミノ酸を保持し、且つ抗原との結合能を有している機能性断片を含む。

[0089] 本明細書中、「エピトープ」とは、抗 $C D H 6$ 抗体が結合する $C D H 6$ の特定の部分ペプチド又は部分立体構造を意味する。前記の $C D H 6$ の部分ペプチドであるエピトープは免疫アッセイ法等当業者にはよく知られている方法によって、決定することができる。まず、抗原の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴヌクレオチド合成技術を用いることができる。例えば、 $C D H 6$ の C 末端又は N 末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組み換え技術を用いて作製した後、それらに対する抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定した後に、更に短いペプチドを合成してそれらのペプチドとの反応性を検討することによって、エピトープを決定することができる。また、複数の細胞外ドメインからなる膜タンパク質に結合する抗体が、複数のドメインからなる立体構造をエピトープとしている場合は、特定の細胞外ドメインのアミノ酸配列を改変することによって、立体構造を改変することによってどのドメインと結合するかを決定することができる。特定の抗体の結合する抗原の部分立体構造であるエピトープは、 X 線構造解析によって抗体と隣接する抗原のアミノ酸残基を特定することによっても決定することができる。

[0090] 本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、共通のエピトープに結合する抗体を意味している。第一の抗体の結合する部分ペプチド又は部分

立体構造に第二の抗体が結合すれば、第一の抗体と第二の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。あるいは、第一の抗体の抗原に対する結合に第二の抗体が競合する（即ち、第二の抗体が第一の抗体と抗原の結合を妨げる）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、第一の抗体と第二の抗体の同一のエピトープに結合すると判定することができる。本明細書中、「同一のエピトープに結合する」とは、第一の抗体と第二の抗体が、当該判定方法のいずれか一方又は両方により、共通のエピトープに結合すると判定された場合をいう。第一の抗体と第二の抗体が同一のエピトープに結合し、かつ第一の抗体が抗腫瘍活性や内在化活性等の特殊な効果を有する場合、第二の抗体も同様の活性を有することが期待できる。

[0091] 本明細書中、「CDR」とは、相補性決定領域（CDR ; Complementarity Determining 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 region）とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0092] 本明細書中、「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）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0.7～1.0 M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。

[0093] 本明細書中、「1～数個」とは、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個又は1～2個を意味する。

[0094] 1. CDH6

カドヘリンは、細胞膜表面に存在する糖タンパク質で、カルシウムイオン依存的にN末端側の細胞外ドメイン同士が結合することで、細胞間接着分子として、また細胞間相互作用を担うシグナル分子として機能する。カドヘリンスーパーファミリーの内、クラシックカドヘリンに分類される分子群は、細胞外に5個の細胞外ドメイン（ECDドメイン）と1個の膜貫通領域、及び細胞内ドメインから構成される1回膜貫通タンパク質である。

[0095] CDH6（Cadherin-6）は、タイプIIカドヘリンファミリーに分類される、790アミノ酸からなる1回膜貫通タンパク質であり、N末端側を細胞外、C末端側を細胞内に持つ。ヒトCDH6遺伝子は1995年に初めてクローニングされ（非特許文献1）、NM_004932、NP_004923（NCBI）等のアクセッション番号により参照可能である。

[0096] 本発明で用いるCDH6タンパク質は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス、サル等）のCDH6発現細胞から直接精製して使用するか、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、CDH6を*in vitro*にて合成する、あるいは遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、CDH6 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってCDH6を発現させることによって、該タンパク質を得ることが出来る。また、前記の

遺伝子操作によるCDH6発現細胞、あるいはCDH6を発現している細胞株をCDH6タンパク質として使用することも可能である。また、CDH6のcDNAを組み込んだ発現ベクターを直接被免疫動物に投与し被免疫動物の体内でCDH6を発現させることもできる。

[0097] また、上記CDH6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、当該タンパク質と同等の生物活性を有するタンパク質もCDH6に含まれる。

[0098] ヒトCDH6タンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する。ヒトCDH6タンパク質の細胞外領域は、配列番号1に記載のアミノ酸配列の54～159番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン1（本明細書中、EC1とも称する）、配列番号1に記載のアミノ酸配列の160～268番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン2（本明細書中、EC2とも称する。）、配列番号1に記載のアミノ酸配列の269～383番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン3（本明細書中、EC3とも称する。）、配列番号1に記載のアミノ酸配列の384～486番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン4（本明細書中、EC4とも称する。）、及び配列番号1に記載のアミノ酸配列の487～608番目のアミノ酸配列を有する細胞外ドメイン5（本明細書中、EC5とも称する。）から構成される。EC1～EC5のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号2～6とする（表1）。

[0099] 2. 抗CDH6抗体の製造

本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。本発明の抗CDH6抗体の一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列からなるアミノ酸配

列を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する抗CDH6抗体を挙げることができる。抗体が「配列番号4に示すアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を特異的に認識」する又は「EC3ドメインを特異的に認識」するとは、抗体が、CDH6のEC3ドメインをCDH6の他の細胞外ドメインと比較して強く認識する又は強く結合することをいう。

[0100] 本発明の抗CDH6抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、サル、ラット、マウス又はウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

[0101] 本発明の抗CDH6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、及び／又は腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性等を備えている。したがって、本発明の抗CDH6抗体と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。

[0102] 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タンパク質も使用可能である。

[0103] 本明細書で言う「高い内在化能」とは、当該抗体とサポリン標識抗ラット IgG 抗体を投与した CDH6 発現細胞の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を 100%とした相対率で表したもの）が、好ましくは 70%以下、より好ましくは 60%以下であることを意味する。

[0104] 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傷害性を腫瘍細胞において特異的及び／又は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を有することが重要であり、好ましい。

[0105] 抗 CDH6 抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができるが、好ましくは、立体構造を保持した CDH6 を抗原として用いることが好ましい。そのような方法として、DNA 免疫法を挙げることができる。

[0106] 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。

[0107] また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, 495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, 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。

[0108] 以下、具体的に CDH6 に対する抗体の取得方法を説明する。

[0109] (1) 抗原の調製

抗原は抗原タンパク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、あるい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。

[0110] また、抗原タンパク質を用いずに、抗原タンパク質のcDNAを発現ベクターに組み込んで被免疫動物に投与し、被免疫動物の体内で抗原タンパク質を発現させ、抗原タンパク質に対する抗体を産生させることによっても抗体を取得することができる。

[0111] (2) 抗CDH6モノクローナル抗体の製造

本発明で使用される抗CDH6抗体は、特に制限はないが、例えば、本願の配列表で示されたアミノ酸配列で特定される抗体を好適に使用することができる。本発明において使用される抗CDH6抗体としては、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体；

(a) CDH6に特異的に結合する、

(b) CDH6と結合することによってCDH6発現細胞に内在化する活性を有する、

(2) CDH6がヒトCDH6である上記(1)に記載の抗体又は当該抗体、

(3) ヒトCDH6のEC3を特異的に認識し、かつ内在化活性を有する。

[0112] 本発明のCDH6に対する抗体の取得方法は、抗CDH6抗体を取得できる限りにおいて、特に制限されないが、高次構造を保持したCDH6を抗原として用いることが好ましい。

[0113] 好ましい抗体の取得方法の一例としてDNA免疫法を挙げることができる。DNA免疫法とは、抗原発現プラスミドをマウスやラットなどの動物個体に遺伝子導入し、抗原を個体内で発現させることによって、抗原に対する免疫を誘導する手法である。遺伝子導入の手法には、直接プラスミドを筋肉に注射する方法や、リポソームやポリエチレンジアミンなどの導入試薬を静脈注

射する方法、ウイルスベクターを用いる手法、プラスミドを付着させた金粒子をGene Gunにより射ち込む手法、急速に大量のプラスミド溶液を静脈注射するHydrodynamic法などが存在する。発現プラスミドの筋注による遺伝子導入法に関して、発現量を向上させる手法として、プラスミドを筋注後、同部位にエレクトロポレーションを加えるin vivo electroporationという技術が知られている(Aihara H, Miyazaki J. Nat Biotechnol. 1998 Sep; 16 (9) : 867-70又はMir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13; 96 (8) : 4262-7.)。本手法はプラスミドの筋注前にヒアルロニダーゼで筋肉を処理することにより、さらに発現量が向上する(McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. Gene Ther. 2001 Aug; 8 (16) : 1264-70)。また、ハイブリドーマの作製は公知の方法によって行うことができ、例えば、Hybrimmune Hybridoma Production System (Cyt o Pulse Sciences社)を用いて行うこともできる。

[0114] 具体的なモノクローナル抗体取得の例としては、以下を挙げることができる。

(a) CDH6のcDNAを発現ベクター（例えば、pcDNA3.1:Thermo Fisher Scientific）に組み込み、エレクトロポレーションや遺伝子銃等の方法によって、そのベクターを直接被免疫動物（例えば、ラットやマウス）に投与することによって、動物体内においてCDH6を発現させることによって、免疫反応を誘起させることができる。エレクトロポレーション等によるベクターの投与は抗体価を上げるために必要であれば、1回でも複数回でもよく、好ましくは複数回である；

(b) 免疫反応を誘起された上述の動物より、抗体産生細胞を含む組織（例えばリンパ節）を採取する；

(c) 骨髓腫細胞（以下「ミエローマ」という）（例えば、マウスミエローマ S P 2 / O - a g 1 4 細胞）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；及び／又は

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

[0115] ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、フローサイトメトリー又は C e l l - E L I S A 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。

[0116] このようにして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、抗 C D H 6 抗体産生ハイブリドーマ r G O 1 9 を挙げることができる。なお、本明細書においては、抗 C D H 6 抗体産生ハイブリドーマ r G O 1 9 が産生する抗体を、「r G O 1 9 抗体」又は単に「r G O 1 9」と記載する。

[0117] r G O 1 9 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G O 1 9 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 1 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。r G O 1 9 抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3 を有する。r G O 1 9 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列からなる。該 r G O 1 9 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。r G O 1 9 抗体の重鎖可変領域は、配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配

列からなるCDRH2及び配列番号19に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3を有する。

[0118] さらに、「2. 抗CDH6抗体の製造」(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や他の方法によって別途にモノクローナル抗体を取得した場合においても、rG019抗体と同等の内在化活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、rG019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、rG019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rG019抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、rG019抗体のCDH6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、rG019抗体とCDH6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CDH6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rG019抗体と同等の抗原結合能、生物活性及び／又は内在化活性を有していることが強く期待される。

[0119] (3) その他の抗体

本発明の抗体には、上記CDH6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)抗体又は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。

[0120] 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)。

- [0121] ラット抗ヒトCDH6抗体由来のキメラ抗体の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体）の軽鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む軽鎖、及び、前記ラット抗ヒトCDH6抗体の重鎖可変領域とヒト由来の定常領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられる。
- [0122] ラット抗ヒトCDH6抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体）の軽鎖可変領域中の1～数残基、1～3残基、1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、前記ラット抗ヒトCDH6抗体の重鎖可変領域中の1～数残基、1～3残基、1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。
- [0123] ラット抗ヒトCDH6抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体）の軽鎖可変領域中のいずれか1～3個のCDR中の1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、前記ラット抗ヒトCDH6抗体の重鎖可変領域中のいずれか1～3個のCDR中の1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。
- [0124] rG019抗体由来のキメラ抗体としては、例えば、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号15に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。
- [0125] rG019抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中の1～数残基、1～3残基、1～2残基、好ましくは1残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換し

た軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中の 1 ～数残基、1 ～3 残基、1 ～2 残基、好ましくは 1 残基のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0126] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域中のいずれか 1 ～3 個の C D R 中の 1 又は 2 残基（好ましくは 1 残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域中のいずれか 1 ～3 個の C D R 中の 1 又は 2 残基（好ましくは 1 残基）のアミノ酸を別のアミノ酸残基に置換した重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

[0127] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の別の例としては、例えば、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び、配列番号 28 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体が挙げられ、当該抗体は任意のヒト由来の定常領域を有してよい。配列番号 28 に示されるアミノ酸配列は、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列中の C D R H 2 中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。

[0128] r G O 1 9 抗体由来のキメラ抗体の具体例としては、配列番号 23 に示される軽鎖全長アミノ酸配列からなる軽鎖、及び、配列番号 26 に示される重鎖全長アミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体が挙げられ、当該キメラ抗ヒト C D H 6 抗体を本明細書中、「キメラ G O 1 9 抗体」、「c h G O 1 9 抗体」又は「c h G O 1 9」と称する。c h G O 1 9 抗体の軽鎖全長アミノ酸配列は配列番号 24 に示されるヌクレオチド配列でコードされ、c h G O 1 9 抗体の重鎖全長アミノ酸配列は配列番号 27 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。

- [0129] c h G 0 1 9 抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、r G 0 1 9 抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列と同一であり、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる。c h G 0 1 9 抗体の軽鎖は、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3 を有し、それぞれ、r G 0 1 9 の軽鎖の C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3 と同一である。c h G 0 1 9 抗体の軽鎖可変領域アミノ酸は、配列番号 2 5 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。
- [0130] c h G 0 1 9 抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列からなる。c h G 0 1 9 抗体の重鎖は、配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 1 9 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 を有する。配列番号 2 8 に示されるアミノ酸配列は、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列中の C D R H 2 中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。配列番号 3 0 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 は、配列番号 1 8 に示される r G 0 1 9 C D R H 2 中のシステイン残基をプロリン残基に置換した配列である。c h G 0 1 9 抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号 2 9 に示されるヌクレオチド配列でコードされる。
- [0131] ヒト化抗体としては、相補性決定領域 (C D R ; C o m p l e m e n t a r i t y D e t e r m i n i n g R e g i o n) のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体 (N a t u r e (1 9 8 6) 3 2 1 , p . 5 2 2 - 5 2 5 参照)、C D R 移植法によって、C D R の配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体 (国際公開第 9 0 / 0 7 8 6 1 号)、更に、抗原に対する結合能を維持しつつ、一部の C D R のアミノ酸配列を改変した抗体を挙げることができる。
- [0132] 本明細書において、r G 0 1 9 抗体又は c h G 0 1 9 抗体由来のヒト化抗体とは、r G 0 1 9 抗体又は c h G 0 1 9 抗体のいずれかについて、各々に

固有の6つのCDR配列を全て保持し、かつ、内在化活性を有するヒト化抗体であればよく、特定のヒト化抗体に限定されない。当該ヒト化抗体は、内在化活性を有する限り、更に一部のCDRの一部のアミノ酸配列が改変されていてもよい。

[0133] chG019抗体のヒト化抗体の実例としては、(1)配列番号33又は37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、(2)上記(1)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列(好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列)、及び(3)上記(1)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに(4)配列番号41、45、49、55又は60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、(5)上記(4)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列(好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列)、及び(6)上記(4)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0134] また、重鎖又は軽鎖の一方をヒト化し、他方をラット抗体やキメラ抗体の軽鎖又は重鎖とした抗体も用いることができる。そのような抗体の例としては、(1)配列番号33又は37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、(2)上記(1)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列(好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列)、及び(3)上記(1)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに(4)配列番号15又は2

8に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、(5)上記(4)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列(好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列)、及び(6)上記(4)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。他の例としては、(1)配列番号10に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、(2)上記(1)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列(好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列)、及び(3)上記(1)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域を含む軽鎖、並びに(4)配列番号41、45、49、55又は60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、(5)上記(4)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列(好ましくは、各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列)、及び(6)上記(4)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域を含む重鎖の任意の組合せを挙げることができる。

[0135] また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下のとおりである：酸性グループ＝アスパギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リジン、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。

[0136] 上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体としては、配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h L O 2 軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖又は配列番号 37 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h L O 3 軽鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する軽鎖、及び、配列番号 41 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H O 1 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖、配列番号 45 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H O 2 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖、配列番号 49 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H O 4 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）、配列番号 55 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H 1 1 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）又は配列番号 60 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列（本明細書中、h H 3 1 重鎖可変領域アミノ酸配列とも称する）を有する重鎖からなる抗体が挙げられる。

[0137] 配列番号 55 に示される h H 1 1 重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号 57 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 58 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 59 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 を有する。配列番号 60 に示される h H 3 1 重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号 62 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 63 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 64 に示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 を有する。

[0138] 好ましい抗体の例としては、

配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 41 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 45 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 49 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 55 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 60 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 37 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 41 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 37 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 45 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 37 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 49 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 37 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 55 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は
配列番号 37 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 60 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
が挙げられる。

[0139] より好ましい抗体の例としては、

配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 41 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 45 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 33 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号

号 4 9 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 3 7 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 4 5 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
配列番号 3 3 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 5 5 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；又は
配列番号 3 3 に示される軽鎖可変領域アミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 6 0 に示される重鎖可変領域アミノ酸配列を有する重鎖からなる抗体；
が挙げられる。

[0140] 上記軽鎖及び重鎖の好適な組合せの抗体の別の例としては、

配列番号 3 1 に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h L 0 2 軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖又は配列番号 3 5 に示される軽鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h L 0 3 軽鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖、及び、

配列番号 3 9 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h H 0 1 重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号 4 3 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h H 0 2 重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号 4 7 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h H 0 4 重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号 6 5 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h H 0 1 A の重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、配列番号 6 7 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h H 1 1 A の重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖又は配列番号 6 9 に示される重鎖全長アミノ酸配列（本明細書中、h H 3 1 A の重鎖全長アミノ酸配列とも称する）の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖

からなる抗体が挙げられる。

[0141] 別の好ましい抗体の例としては、

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 39 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 43 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 47 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 65 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 67 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 35 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 39 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 35 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 43 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

配列番号 35 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 47 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；

0～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
配列番号35に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
配列番号35に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；又は
配列番号35に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体；
が挙げられる。

[0142] より好ましい抗体の例としては、

配列番号31に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号39に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H01L02抗体」又は「H01L02」とも称する）；
配列番号31に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H02L02抗体」又は「H02L02」とも称する）；
配列番号31に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号47に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H04L02抗体」又は「H04L02」とも称する）；
配列番号35に示される軽鎖全長アミノ酸配列の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43に示される重鎖全長アミノ酸配列の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H02L03抗体」又は「H02L03」とも称する）；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 65 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H01L02A 抗体」又は「H01L02A」とも称する）；

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 67 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H11L02A 抗体」又は「H11L02A」とも称する）；又は

配列番号 31 に示される軽鎖全長アミノ酸配列の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 に示される重鎖全長アミノ酸配列の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖からなる抗体（本明細書中、「H31L02A 抗体」又は「H31L02A」とも称する）；

が挙げられる。

[0143] 上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い同一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。このような同一性は、一般的には 80%以上の同一性であり、好ましくは 90%以上の同一性であり、より好ましくは 95%以上の同一性であり、最も好ましくは 99%以上の同一性である。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。

[0144] 二種類のアミノ酸配列間の同一性は、ClustalW version 2 (Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007), 「Clustal W and Clustal X version 2.0」, Bi

informatics. 23 (21) : 2947-2948) のデフォルトパラメーターを使用して配列を整列させることによって決定することができる。

- [0145] なお、配列番号 31 に示される hL02 軽鎖全長アミノ酸配列中、1～20 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21～128 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、129～233 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。
- [0146] 配列番号 35 に示される hL03 軽鎖全長アミノ酸配列中、1～20 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21～128 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、129～233 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。
- [0147] 配列番号 39 に示される hH01 重鎖全長アミノ酸配列中、1～19 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20～141 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、142～471 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。
- [0148] 配列番号 43 に示される hH02 重鎖全長アミノ酸配列中、1～19 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20～141 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、142～471 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。
- [0149] 配列番号 47 に示される hH04 重鎖全長アミノ酸配列中、1～19 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20～141 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、142～471 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。
- [0150] 配列番号 65 に示される hH01A 重鎖全長アミノ酸配列中、1～19 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20～141 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、142～471 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。
- [0151] 配列番号 67 に示される hH11A 重鎖全長アミノ酸配列中、1～19 番

目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20～141番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、142～471番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。

[0152] 配列番号69に示されるhH31A重鎖全長アミノ酸配列中、1～19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20～141番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、142～471番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。

[0153] 本発明の抗体としては、さらに、CDH6に結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗CDH6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CDH6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。

[0154] このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome, YAC)ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物として、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。

- [0155] また、遺伝子組換え技術によって、そのようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターによって真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することによって、この抗体を培養上清中から得ることもできる。
- [0156] 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。
- [0157] 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。
- [0158] 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。
- [0159] 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。
- [0160] 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. R

e v. Immunol (1994) 12, p. 433-455、Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105-1116)。

[0161] 新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、chG019抗体、H01L02抗体、H02L02抗体、H02L03抗体、H04L02抗体、H01L02A抗体、H11L02A抗体又はH31L02A抗体）のいずれか1つが結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体が当該ラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6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。あるいは、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、chG019抗体、H01L02抗体、H02L02抗体、H02L03抗体、H04L02抗体、H01L02A抗体、H11L02A抗体又はH31L02A抗体）のCDH6に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する（例えば、該ヒト抗体が、rG019抗体、chG019抗体、H01L02抗体、H02L02抗体、H02L03抗体、H04L02抗体、H01L02A抗体、H11L02A抗体又はH31L02A抗体と、CDH6、好ましくは、CDH6のEC3への結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体が本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6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。本明細書において、当該判定方法の少なくともいずれか一方の方法により「同一のエピトープに結合する」と判定された場合、新たに作製されたヒト抗体が、本明細書に記載のラット抗ヒトCDH6抗体、キメラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6抗体と「同一のエピトープに結合する」といえる。エピトープが同一であることが確認された場合、該ヒト抗体がラット抗ヒトCDH6抗体、キ

メラ抗ヒトCDH6抗体又はヒト化抗ヒトCDH6抗体（例えば、rG019抗体、chG019抗体、H01L02抗体、H02L02抗体、H02L03抗体、H04L02抗体、H01L02A抗体、H11L02A抗体又はH31L02A抗体）と同等の生物活性を有していることが期待される。

- [0162] 以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。
- [0163] 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。示差走査カロリーメトリー（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（ T_m ）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 T_m 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（Lorri 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。
- [0164] 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、又はN末グルタ

ミンもしくはN末グルタミン酸のピログルタミン酸化)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と等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体の修飾物は、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。

[0165] 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1999/54342号、同2000/61739号、同2002/31140号、WO2007/133855等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

[0166] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

[0167] 真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182、ATCC CRL-1650）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC No. CRL-1658）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC CCL-61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 41

26-4220)、FreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) を挙げるができる。

[0168] 原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げるができる。

[0169] 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。

[0170] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失することが知られており (Journal of Chromatography A, 705:129-134 (1995))、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの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、抗体の抗原結合能又はエフェクター機能 (補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用等) には影響を及ぼさない。従って、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つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体 (例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖) 等も包含される。但し、抗原結合能又はエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよい。

し、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端の1つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0171] 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、IgG2又はIgG4を挙げることができる。

[0172] 本発明の抗体のアイソタイプとしてIgG1を用いる場合は、定常領域のアミノ酸残基の一部を置換することによって、エフェクター機能を調整することが可能である。エフェクター機能を低減又は減弱させたIgG1の変異体としては、IgG1 LALA (IgG1-L234A, L235A)、IgG1 LAGA (IgG1-L235A, G237A)等が挙げられ (Journal of Virology, Vol. 75, No. 24 (Dec. 15, 2001), pp. 12161-12168)、好ましくはIgG1 LALAである。なお、前記L234A, L235AはEU index (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 63, No. 1 (May 15, 1969), pp. 78-85)により特定される234位、235位のロイシンのアラニンへの置換、G237AはEU indexにより特定される237位のグリシンのアラニンへの置換を示す。

[0173] 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機能は、CDH6に対する結合活性であり、好ましくはCDH6と結合することによってCDH6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

っていても良い。

- [0174] 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、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) が、これらに限定されるものではない。
- [0175] 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。
- [0176] 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。
- [0177] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げることができる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (ファルマシア)等を挙げることができる。
- [0178] 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。
- [0179] 本発明はまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、以下の(a)～(e)のいずれか

一つに記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドである。

(a) 本発明のCDH6抗体の重鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと軽鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ、

(b) 本発明のCDH6抗体のいずれか一つの抗体のCDRH1～CDRH3を含む重鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドとCDRL1～CDRL3を含む軽鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ

(c) 本発明のCDH6抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ

(d) (a)～(c)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなるヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ、CDH6に結合する抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、及び、

(e) (a)～(c)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドにおいて1～50個、1～45個、1～40個、1～35個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、1～10個、1～8個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1若しくは2個、または1個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入してなるポリペプチドのアミノ酸配列をコードし、且つ、CDH6に結合する抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

[0180] 本発明は、本発明の抗体もしくはその機能性断片又はその修飾体をコードするヌクレオチド、該遺伝子が挿入された組換えベクター、該遺伝子又は該ベクターが導入された細胞を含む。

[0181] また、本発明は、前記細胞を培養する工程、及び、その培養物から抗体もしくはその機能性断片又はその修飾体を回収する工程を含む、抗体もしくはその機能性断片又はその修飾体の製造方法も含む。

[0182] 本発明の抗体のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列、並びに、本発明において使用された蛋白質のアミノ酸配列又は核酸のヌクレオチド配列を表1－

1 ～ 表 1 - 1 4 に示す。

[0183] [表1-1]

配列 番号		配列
1	ヒトCDH6 ORFのアミノ酸 配列	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIKIHDIINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFFVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNNITLTDVNDNPPRFPOSTYQFKTPESSPPGT PIGRISKASDADVGENAEI EYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIIITVKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHYEPFLYLGPFKDSATVRI VVEDVDEPPVFSKLAYILOIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQLHAVD KDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSGTGTVTRVCACDHGNGMSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNI VSYNDEGGGEEDTQAFDITGLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSKD
2	ヒトCDH6 EC1	SWMNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDI QATKRLDREKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIKIHDIINDNEPIF
3	ヒトCDH6 EC2	TKEVYTATVPEMSDVGTFFVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGI KTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNNITLTDVNDNPPRF
4	ヒトCDH6 EC3	POSTYQFKTPESSPPGTPIGRISKASDADVGENAEI EYSITDGEGLDMFDVITDQETQ EGIIITVKLLDFEKKKVYTLKVEASNPHYEPFLYLGPFKDSATVRI VVEDVDEPPV F
5	ヒトCDH6 EC4	SKLAYILOIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSDRHTMDRIFNIDSGNGSI FTSKLLDRETLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPE
6	ヒトCDH6 EC5	EFAEFYETFVCEKAKADQLIQLHAVDKDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNK DNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSGTGTVTRVCACDHGNGMSC HAEALIHPT
7	カニクイザル CDH6 ORFのア ミノ酸配列	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSKNELNRSKRSMW NQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPVYILRAQAINRRTGRPVEPESEFIKIHDIINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFFVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNNITLTDVNDNPPRFPOSTYQFKTPESSPPGT PIGRISKASDADVGENAEI EYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIIITVKLLDFEKKKV YTLKVEASNPHYEPFLYLGPFKDSATVRI VVEDVDEPPVFSKLAYILOIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQLRAVD KDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVI SDNDYPVQSSGTGTVTRVCACDHGNGMSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNI VSYNDEGGGEEDTQAFDITGLRNPEAIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPTAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSKD
8	カニクイザル CDH6 プライ マー1	CACCATGAGAACTACCGCTACTTCTTGCTGCTC

[0184] [表1-2]

9	カニクイザル CDH6 プライ マー2	TTAGGAGTCTTTGTCACTGTCCACTCCTCC
10	rG019軽鎖可変 領域アミノ酸 配列	DIQMTQSPSLLSASVGDRTLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTG IPSRFSGSGSGSDFTLTISLLQPEDVATYFCQQYYSGWAFGGVTNLELKRA
11	rG019軽鎖可変 領域ヌクレオ チド配列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCACTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC ACTCTCAACTGCAAAGCAAGTCAGAATATTTATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAA AAGCTTGGAGAAGGTCCCAAACCTCCTGATTTATGATGCAAACACTTTGCAAACGGGC ATCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTTCAGATTTCACACTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGCCAGCAGTACTATAGCGGGTGG GCGTTCGGTGGAGTCACCAACCTGGAATTGAAACGGGCT
12	rG019 CDRL1	KASQNIYKNLA
13	rG019 CDRL2	DANTLQT
14	rG019 CDRL3	QQYYSGWA
15	rG019重鎖可変 領域アミノ酸 配列	QVQLQDSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYCGDGE TEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYFDWFQ GVMVTVSS
16	rG019重鎖可変 領域ヌクレオ チド配列	CAGGTACAGCTGCAGCAATCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAA ATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACGAGGAACCTTATGCACTGGATAAAA CAGCAGCCTGGAATGGCCTTGAGTGGATTGGGTGGATTATTTGTGGAGATGGTGAG ACAGAGTACAATCAAAAGTTCAATGGGAAGGCAACACTCACTGCGGACAGATCCTCC AGCACAGCCTATATGGAGCTCAGCAGACTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTT TGTGCAAGAGGGGTTTACGGAGGGTTTGCCGGGGGCTACTTTGATTTCTGGGGCCAA GGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA
17	rG019 CDRH1	GYTFTRNFMH
18	rG019 CDRH2	WIYCGDGETE
19	rG019 CDRH3	GVYGGFAGGYFDF
20	ヒト軽鎖シグ ナル配列及び ヒトκ鎖定常 領域をコード するDNA配列を 含むDNA断片	gcctcggactctagagccaccATGGTGTGTCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCT GCTGTGGATCTCCGGCGGTACGGCGATATCGTGATGATTAAACGTACGGTGGCCGC CCCCTCGTGTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTC CGTGGTGTGCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAA GCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACGAGGCTGAGTCCCCCGTCACCAA GAGCTTCAACAGGGGGGAGTGTtaggggccccgtttaaacggggaggcta

[0185]

[表1-3]

21	ヒト重鎖シゲナル配列及びヒトIgG1定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片	gcctccggactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAATTGTGACAGCGGTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAGAGCACCTCTGGCGGACAGCGGCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCGAACGTGAATCACAAGGCCAGCAACACCAAGTGGACAAGAGAGTTGAGGCCAAAATCTTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAATCTCCTGGGGGAGCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACGCAAGGACACCTCATGATCTCCCCGAGCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAGCTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACTACAAGAACCCCTCCCGTGTCTGCACTCCGAGCGGCTCCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCGTGCTCCCGGCAAAatgagatatcgggcccggtttaacgggggaggcta
22	chG019軽鎖をコードするDNA配列を含むDNA断片	ccagcctccggactctagagccaccATGGTGTGTCAGAGCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGCGATAGAGTGACCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGAGCCCAACCCCTGCAGACCGGCATCCCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCACCGGCTCCGACTTCACCGTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCGAGAGACGTGGCCACCTTCTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCCTTCGGCGCGGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCCGTGGCCGCTCCCTCGTGTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCGCTGTGCTGCGCTGCTGAACAATCTCTACCCCGCGAGGCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGACCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGTtagttaaacggggaggctaact
23	chG019軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFLISLLWISGAYGDIQMTQSPSLLSASVGDRTLNCKASQNIYKNLAWYQKLGEGPKLLIYDANTLQTGIPSRFSGSGSDFLTLISSLQPEDVATYFCQQYYSCWAFGGVTNLELKRVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVGLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0186]

[表1-4]

24	chG019軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAACTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGCATCCCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGGCTGGGCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCGGTGGCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCAGCGCTCTGTCTGTGTCCTGCTGAACAATTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCGCTGACCAAGAGCTTAACCGGGGCGAGTGT
25	chG019軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCTGAACTGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGGATCCCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCTGGCCTTCGGCGGCGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCC
26	chG019重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYPGDGETEYNQKFNKGKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGGQVMVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNKKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0187]

[表1-5]

27	chG019重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACCTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCTGACCGCGGACAGAAGCAGC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCGGCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGACTTT TGCGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCAGCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTG GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCGCAACCGGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGCTGCTCCTGCACTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCACCTGCCCAGCACCTGAAGTCTGGGGGGACCTCAGTCTTCTC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGGCCCGGGAGGAGGAGTACAACAGCAGC TACCGGGTGGTCAAGCTCCTCAGCTCCTGACCCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGGCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAG GAGATGACCAAGAACCGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAAGCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTG CACAACTACACCCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
28	chG019重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIKQPGNGLEWIGWJYPGDGE TEYNQKFNKGATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDNAVYFCARGVYGGFAGGYFDWFGQ GVMVTVSS
29	chG019重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGAACCTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCTGACCGCGGACAGAAGCAGC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCGGCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGACTTT TGCGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCACCGTCAGCTCA
30	chG019 CDRH2	WIYPGDGETE
31	hL02軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFCQQYYSG WAFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF NRGEC

[表1-6]

32	hL02軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCGGCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAAGTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGAGCTCCCCGTACCAAGAGCTTC AACAGGGGGGAGTGT
33	hL02軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGGGTKEIKRT
34	hL02軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGC GTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCTCCGACTTCACCCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
35	hL03軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIYKNLAWYQOKLGEQPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
36	hL03軽鎖全長ヌクレオチド配列	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCTGGGCGAGGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCGGCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAAGTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGAGCTCCCCGTACCAAGAGCTTC AACAGGGGGGAGTGT
37	hL03軽鎖可変領域アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQTGVPSRFSGSGSGDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGGGTKEIKRT

[表1-7]

38	hL03軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCTGCAGACCGGC GTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTTCACCTGACATCAGC AGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTTGGCCAGGGCACCAAGTGGAATCAAGCGTACG
39	hH01重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLVLAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGGLEWMGWIYPGDGETEYAKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYDFWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
40	hH01重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGCGCCAGCGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTTACCCGGAATTCATGCACTGGGTGCCG CAGGCTCCAGGCCAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACAGCACC TCCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTCCCCCTG GCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCT GACAGATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGAGCCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGACCCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGGCCCATCGAGAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
41	hH01重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGGGLEWMGWIYPGDGE TEYAKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLVTVSS

[表1-8]

42	hH01重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACATTCATGCACTGGGTGGCG CAGGCTCCAGGCCAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGCGACGGCGAG ACAGAGTAGCCGAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCAGCGCCGACACAGCACC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGACACCGCGGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTAGTTGATTTTTGGGGCCAG GGCACCTCGTGACCGTCAGCTCA
43	hH02重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLVLAAPRWLSEVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFRNFMHWVR QAPGGGLEWMGW1YPGDGETEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYF CARGVYGGFAGGYDFWGGQTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
44	hH02重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACATTCATGCACTGGGTGGCG CAGGCTCCAGGCCAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCAGCGCCGACAGAAAGCACC AGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCTGCGGAGCGAGGATACCGCGGTGTACTTC TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTAGTTGATTTTTGGGGCCAG GGCACCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCAAGCGCTTCCCGCTG GCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCGCTGGGTGCTGCTGCTCAAG GACTACTTCCCGGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCTGACACAGCGGC GTGCACACCTTCCCGCTGTCTGCACTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCACCTGCCCAGCACCTGAAGTCTGGGGGGACCCCTAGTCTTCTCTC TTCCCCCAAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACATGC GTGGTGGTGGAGTGAAGCAGCAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAG TACCGGGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCTGACCGAGGACTGGTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGAACACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGTGAGTCCGAGGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
45	hH02重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFRNFMHWVRQAPGGGLEWMGW1YPGDGE TEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLVTSS

[表1-9]

46	hH02重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACCTCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCCAGCGCGAGACAGAGTACAACCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAGCACCAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCGGTGTACTTCTGTGCCAGAGGCGGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTCAGCTCA
47	hH04重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIRQAPGGGLEWMGWIIYPGDGETEYAQKFQGRVLTADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYFDWGGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	hH04重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACCTCATGCACTGGATCCCGCAGGCCCTGGACAGGCGCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCCAGCGCGAGACAGAGTACGCCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCTGACCGCCGACAGAAGCACCAGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCGGTGTACTATGTGCCAGAGGCGGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAGCGGCGTGACACAGCTTCCCGCTGTCTGTCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCCACCTGCCCAGCACCTGAAGTCTTGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCAGCGTCTGCACCAAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAAACACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
49	hH04重鎖可変領域アミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIRQAPGGGLEWMGWIIYPGDGETEYAQKFQGRVLTADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYFDWGGGTLTVSS

[表1-10]

50	hH04重鎖可変領域ヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCGGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTTCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACTTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCTGGACAGGGCTGGAATGGATGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAATCCAGGGCAGAGTACCCTGACCGCGCAGAGAAGCACC AGCACCGCTACATGGAAGTGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGGTACGGCGGCTTGGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCGAG GGCACCTCGTGACCGTCAAGCTCA
51	NOV0712軽鎖全長アミノ酸配列	MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNNYQ QKPGKAPKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGTF PPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
52	配列番号51に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列	ATGGTGTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTAC GGCGACATCCAGATGACCGAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAACTGCTGATCTACGCCGTGTCCACACTGCAGAGC GGCGTGCCCGAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTGACGAGTCCGGCACCTTC CCCCCACCACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCC CCCTCCGTGTTTCATCTTCCCGCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCC GTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCAGCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTAGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCGTACCAAG AGCTTCAACAGGGGGAGTGT
53	NOV0712重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLVAAPRWLSQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSGHMHWVR QAPGKGLEWVSVISGSGSNTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTAVYY CARQWGSYAFDSWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFGCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

[0193]

[表1-11]

54	配列番号53に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCTGGCGGCTCTCTGAGA CTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCCACGGAATGCACTGGGTGGC CAGGCCCTGGAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGGCAGCGGCTCCAAT ACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG AACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGACACCGCGGTACTAT TGTGCCAGACAGTGGGCGAGCTACGCCCTTCGATTCTTGGGGCCAGGGCACCTCGTG ACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGTGGCACCTCTCTCC AAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCCGTGACCGTGAGCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC CCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA CCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACCGTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAC GTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGGCTGGTG AGCGTCTCACCCTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGC CAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGCAAA
55	hH11の重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVROAPGQGLEWMGWIAPGDGE TEYAKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGFAGGYDFWQG GTLVTVSS
56	hH11の重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTAAAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAG GTGCTCTGCAAGGCTCTGGCTACACATTCACCCGGAACCTCATGCACTGGGTCCGA CAGGCTCCAGGACAGGACTTGAATGGATGGATGGATTGCTCCCGGCACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCTCTACA AGCACCGCTACATGGAAGTGAAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCGGTGACTAT TGTGCCAGAGGCGGTGACGGCGATTGCTGGCGGCTACTTTGATTTTGGGGCCAG GGCACCTGGTCACCGTGAGCTCA
57	hH11 CDRH1	GYTFTRNFMH
58	hH11 CDRH2	WIAPGDGETE
59	hH11 CDRH3	GVYGGFAGGYDF
60	hH31の重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVROAPGQGLEWMGWIYPGDGE TEYASKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGAGGYDFWQG GTLVTVSS

[表1-12]

61	hH31の重鎖可変領域ヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACATTACCCGGAACCTTCATGCACTGGGTCCGA CAGGCTCCAGGACAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGCAATTTACGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCTCTACA AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGACTAT TGTGCCAGAGGCGTTTACGGCGGAGCCGCTGGCGGCTACTTTGATTTTGGGGCCAG GGCACCTGGTCACCGTGAGCTCA
62	hH31 CDRH1	GYTFTRNFMH
63	hH31 CDRH2	WIYPGDGETE
64	hH31 CDRH3	GVYGAAGGYDF
65	hH01Aの重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGGLEWMGWYIPGDGETEYAKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYY CARGVYGGFAGGYDFWGGGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCGSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
66	hH01Aの重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAG GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACATTACCCGGAACCTTCATGCACTGGGTCCGA CAGGCTCCAGGACAGGGAAGTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCTCTACA AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGATTGCTGGCGGCTACTTTGATTTTGGGGCCAG GGCACCTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGCTTCCCCCTG GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGCTGTCCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACT CACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCCCTCAGTCTTGCTC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGAGGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAG GAGATGACCAAGAAGCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACTACAAGACCAAC CCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA

[表1-13]

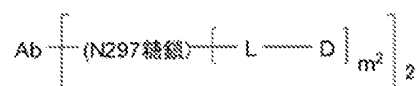
67	hH11Aの重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGGLEWMGWIPGDGETEYAKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYDFWGGGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
68	hH11Aの重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCGAAGTGAAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAG GTGCTCTGCAAGGCCTCTGGCTACACATTCACCCGGAACCTCATGCACTGGGTCCGA CAGGCTCCAGGACAGGGAAGTGAATGGATGGGATGGATTGCTCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTAGCCCGAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATCAGCGCGACACCTCTACA AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGGTGTACGGCGGATTGCTGGCGGCTACTTTGATTTTGGGGCCAG GGCACCTGCTCAGCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTG GCACCTCTCTCAAGAGCAGCTCTGGCGGCGACAGCGCGCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCGCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCT CACACATGCCCCACCTGCCAGCAGCTGAAGCGCGCGGGGGACCGCTCAGTCTTCTC TTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCGCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGGTGGTCAAGCTCTCAGCGTCTGACCGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACC CTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
69	hH31Aの重鎖全長アミノ酸配列	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGGLEWMGWIPGDGETEYASKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGAAGGYDFWGGGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[表1-14]

70	hH31Aの重鎖全長ヌクレオチド配列	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAGCCTGGCGCCTCTGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCTCTGGCTACACATTACCCGGAATTCATGCACTGGGTCCGA CAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCAGCAAATTTAGGGCAGAGTGACCATCACGCCGACACCTCTACA AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTTTACGGCGGAGCCGCTGGCGGCTACTTTGATTTTGGGGCCAG GGCACCGTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTG GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGTGCGTGGTCAAG GACTACTTCCCGAACCCTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACAGCTTCCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGGCTCCAGCAGCTTGGGCACCGAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT CACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTC TTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAAGTGGTACGTGGAG GGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGGTGGTCAGCGTCTCAGCGTCTGCACAGGAGTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACC CCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCCGGCAAA
71	ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgGLALA定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片	ccagcctccgactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGT GGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAATTGTGAGGCGGTAGCTCAGCC TCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGC GGCAGACCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACCGTG AGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGCTGTCTGCAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCAGACATGCCACCCCTGCCAGCACCT GAAGCCGCGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCTCTCAGCGTC CTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCC CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGGAACCA CAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCGTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTC TTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCCGGCAAAtgagatatcgggcccggtttaaacggggaggctaac

本発明の抗体薬物コンジュゲートは、次式：

[0198] [化34]



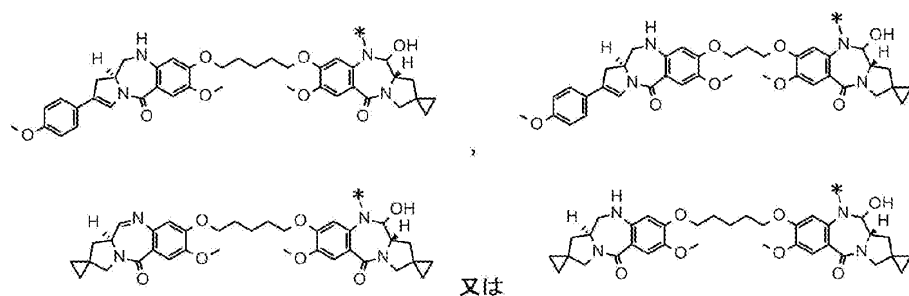
[0199] (式中、 m^2 は1又は2の整数を示し、

A bは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

Lは、A bのN 2 9 7に結合する糖鎖（N 2 9 7）とDを連結するリンカーであり、

Dは、以下：

[0200] [化35]



[0201] から選択されるいずれか一つであり、式中、*はLと結合していることを示す)

で表される。

[0202] <薬物>

上記「2. 抗CDH6抗体の製造」にて取得された抗CDH6抗体はリンカー構造部分を介して薬物を結合させることによって、抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートとすることができる。薬物としては、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CDH6抗体-薬物コンジュゲートは結合する薬物に応じて種々の用途に用いること

ができる。そのような薬物の例としては、抗腫瘍活性を有する物質、血液疾患に対する効果を有する物質、自己免疫疾患に対する効果を有する物質、抗炎症物質、抗菌物質、抗真菌物質、抗寄生虫物質、抗ウイルス物質、抗麻酔物質等を挙げることができる。

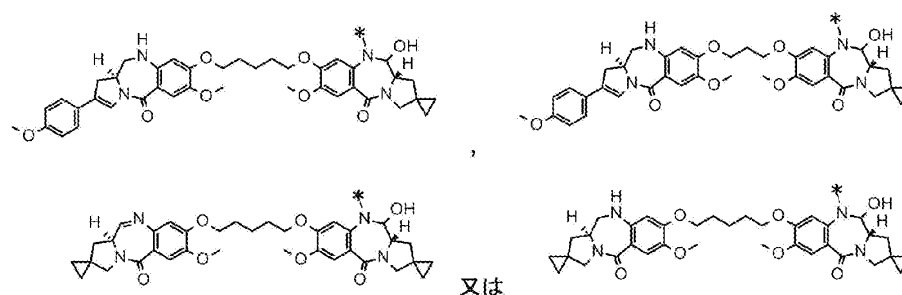
[0203] <抗腫瘍化合物>

本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートに結合される化合物として抗腫瘍性化合物を用いる例について以下に述べる。抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍効果を有する化合物であって、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離されて抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が本来の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。当該遊離薬物として実施例10-7～10-10に記載の薬物1～4が挙げられる。

[0204] 上記「2. 抗CDH6抗体の製造」にて取得された抗CDH6抗体はリンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させることによって、抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートとすることができる。

[0205] 本発明で使用される抗腫瘍性化合物は、以下：

[0206] [化36]



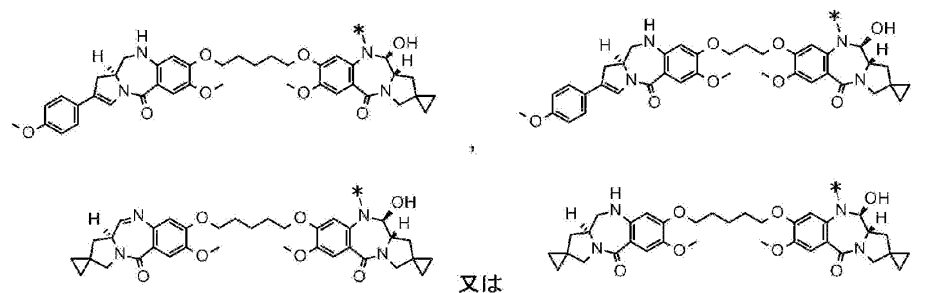
[0207] から選択されるいずれか一つである（式中、*はLと結合していることを示す）。本発明のPBD誘導体は11'位に不斉炭素が存在するため、光学異性体が存在する。本明細書において、これらの異性体、およびこれらの異性体の

混合物がすべて単一の式で表されている。従って、上記の本発明の P B D 誘導体は、それぞれ、光学異性体及び光学異性体の任意の割合での混合物を含む。上記の本発明の P B D 誘導体の 1 1' 位の絶対立体配置は結晶性の生成物又は中間体もしくはそれらの誘導体の X 線結晶構造解析や Mosher 法等の NMR により決定することができる。その際、立体配置が既知である不斉中心を持つ試薬で誘導化された結晶性の生成物又は中間体を用いて絶対立体配置を決定してもよい。立体異性体は、合成した本発明に係る化合物を所望により通常の光学分割法又は分離法を用いて単離することにより得ることができる。

[0208] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート、その遊離薬物もしくはその製造中間体には、立体異性体あるいは不斉炭素原子に由来する光学異性体、幾何異性体、互変異性体又は d 体、l 体、アトロプ異性体等の光学異性体が存在することもあるが、これらの異性体、光学異性体及びこれらの混合物のいずれも本発明に含まれる。

[0209] 本発明で使用される抗腫瘍性化合物は、以下：

[0210] [化37]

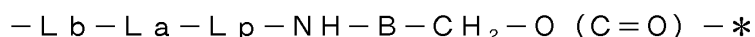


[0211] から選択されるいずれか一つである（式中、*はLと結合していることを示す）。

<リンカー構造>

本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいて抗腫瘍性薬物を抗体に結合するリンカー構造について説明する。

[0212] 当該リンカーLは、次式：



で示される。

- [0213] *は上記Dで表される抗腫瘍性化合物のN10'位の窒素原子と結合していることを示し、Lbは、LaとAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサーを示す。
- [0214] Bは、フェニル基又はヘテロアリール基を示し、好ましくは、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、2,5-チエニル基であり、より好ましくは、1,4-フェニル基である。
- [0215] Lpは、生体内又は標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示す。Lpは、例えば、エステラーゼやペプチダーゼ等の酵素の作用によって、切断される。
- [0216] Lpは、2から7個（好ましくは、2から4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。
- [0217] Lpは、N末端においてLb-LaのLaのカルボニル基に結合し、C末端においてリンカーの-NH-B-CH₂-O(C=O)-部分のアミノ基(-NH-)とアミド結合を形成する。前記エステラーゼ等の酵素によって、LpのC末端と-NH-間の結合が切断される。
- [0218] Lp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。
- [0219] Lp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、グリシン(Gly; G)、バリン(Val; V)、アラニン(Ala; A)、フェニルアラニン(Phe; F)、グルタミン酸(Glu; E)、イソロイシン(Ile; I)、プロリン(Pro; P)、シトルリン(Cit)、

ロイシン (Leu ; L)、セリン (Ser ; S)、リジン (Lys ; K) 及びアスパラギン酸 (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、グリシン (Gly ; G)、バリン (Val ; V)、アラニン (Ala ; A)、シトルリン (Cit) である。

これらのアミノ酸は重複してもよく、任意に選択されたアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。また、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。

[0220] リンカーL pの具体例として、

—GGVA—、—GG—(D—)VA—、—VA—、—GGFG—、—GGPI—、—GGVCit—、—GGVK—、—GG(D—)PI—、—GGPL—、—EGGVA—、—PI—、—GGF—、DGGF—、(D—)D—GGF—、—EGGF—、—SGGF—、—KGGF—、—DGGFG—、—GGFGG—、—DDGGFG—、—KDGGFG—、—GGFGGGF—

を挙げることができる。

[0221] ここで、上記の『(D—)V』はD—バリン、『(D—)P』はD—プロリン、『(D—)D』はD—アスパラギン酸を意味する。

[0222] リンカーL pは、好ましくは、以下である。

—GGVA—、—GG—(D—)VA—、—VA—、—GGFG—、—GGPI—、—GGVCit—、—GGVK—、—GG(D—)PI—、—GGPL—

リンカーL pは、より好ましくは、以下である。

[0223] —GGVA—、—GGVCit—、—VA—

L bは、L aと抗体A bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサーを示す。

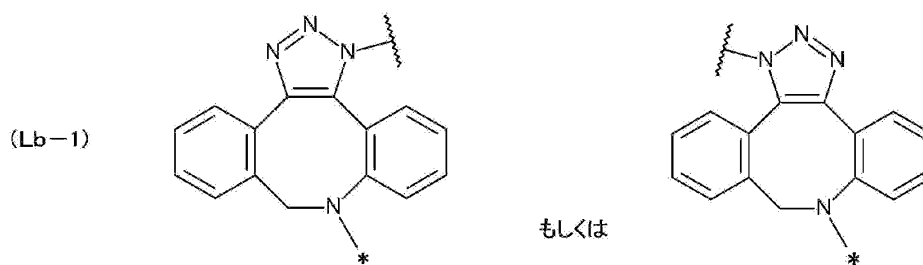
[0224] L aは特に限定されないが、例えば、以下の群から選択されるいずれか一つを示す。

—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—、

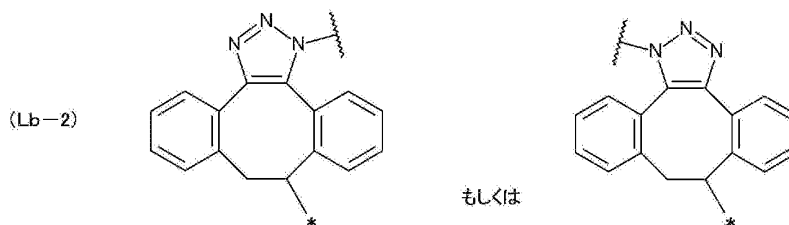
$-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2-$
 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2-$
 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、及び、
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 からなる群から選択されるいずれか一つを示し、L aは、より好ましくは、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$ である。

[0225] L bのスペーサーは特に限定されないが、例えば、次式で示されるスペーサーが挙げられる。

[0226] [化38]

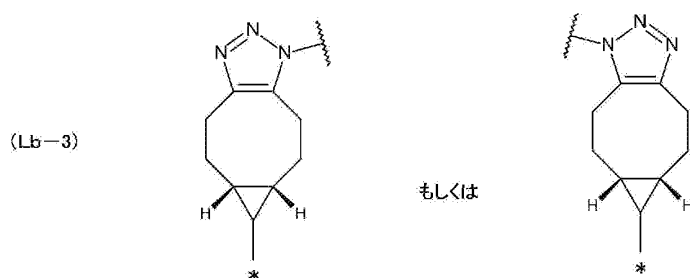


[0227] [化39]



[0228]

[化40]



[0229] 上記で示されるL bのそれぞれの構造式において、*はL aの左端の—(C=O)、O又は—CH₂と結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す。

[0230] 上記で示されるL b (L b-1、L b-2又はL b-3)のそれぞれの構造式において、アジド基とシクロオクチニル基のclick reactionで形成されるトリアゾール環部位は、幾何異性構造を有し、1つのL b中に、これら2種類の構造のいずれか一方、又は、それらの混合物として存在する。本発明の抗体-薬物コンジュゲート1分子中には2又は4個(上記m²が1又は2)の『-L-D』が存在し、それぞれの『-L-D』におけるL中のそれぞれのL b (L b-1、L b-2又はL b-3)は、これら2種類の構造のいずれか一方、又は、その両方が混在している。

[0231] L bが、i)の場合、Lは、好ましくは、—L b—L a—L p—NH—B—CH₂—O(C=O)—*で示され、

Lが、以下の群：

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGVA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GG—(D—)VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

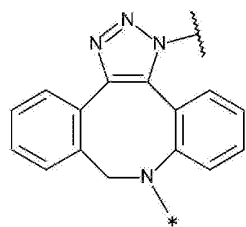
—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

—Z¹—C(=O)—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—VA—NH—B—CH₂—

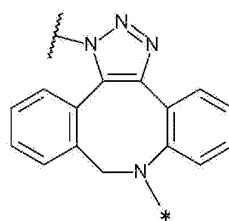
$-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGPI}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2$
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2$
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGVCit}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2$
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGVK}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2$
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGPL}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2$
 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{Z}^2-\text{OC}(=\text{O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、及び
 $-\text{Z}^3-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$
 から選択され、

ここで、 Z^1 は、以下の構造式：

[0232] [化41]



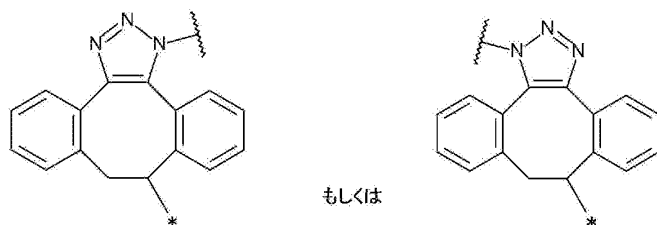
もしくは



[0233] を示し、

Z²は、以下の構造式：

[0234] [化42]

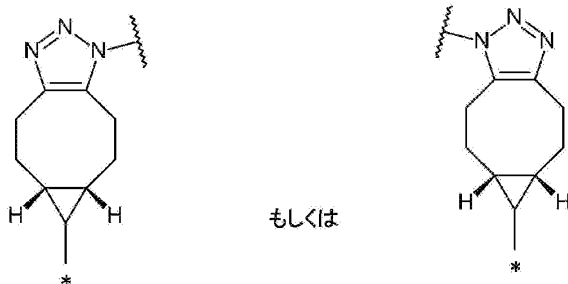


もしくは

[0235] を示し、

Z³は、以下の構造式：

[0236] [化43]



もしくは

[0237] を示し、

ここで、Z¹、Z²及びZ³の構造式において、*はZ¹、Z²又はZ³に隣接するC(=O)、O又はCH₂と結合していることを示し、波線はA_bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示し、並びに、

Bは、1,4-フェニル基を示す。

[0238] 本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、その大部分が腫瘍細胞内に移行した後、リンカー部分（例えば、L_p）が酵素等によって切断され活性化されると、薬物D部分が遊離し（以下、遊離薬物という）、抗腫瘍活性を発揮すると考えられる。

[0239] 従って、本発明の抗体-薬物コンジュゲートは腫瘍細胞外で安定であることが好ましい。

[0240] <糖鎖リモデリング>

近年、不均一な抗体の糖タンパク質を、酵素反応等によってリモデリングし、官能基を有する糖鎖を均一に導入する方法が報告されている（ACS Chemical Biology 2012, 7, 110、ACS Medicinal Chemistry Letters 2016, 7, 1005）。この糖鎖リモデリング技術を用いて、部位特異的に薬物を導入し、均一なADCを合成する試みもなされている（Bioconjugate Chemistry 2015, 26, 2233、Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361–2367、US2016361436）。

[0241] 本発明の糖鎖のリモデリングはまず加水分解酵素を利用して、蛋白質（抗体等）に付加されている不均一な糖鎖を末端のGlcNAcのみ残して切除し、GlcNAcが付加した均一な蛋白質部分を調製する（以下、「アクセプター」と言う）。次に、別途調製した任意の糖鎖を用意し（以下、「ドナー」と言う）、このアクセプターとドナーを糖転移酵素を用いて連結する。これにより、任意の糖鎖構造を持った均一な糖蛋白質を合成できる。

[0242] 本発明において、「糖鎖」とは、2つ以上の単糖がグリコシド結合により結合された構造単位を意味する。具体的な単糖や糖鎖を、例えば”GlcNAc-”、“MSG-”のように、略号として標記することがある。構造式中でこれらの略号で記載した場合、還元末端で別の構造単位とのグリコシド結合に帰属する酸素原子又は窒素原子は、特別な定義がある場合を除き、当該糖鎖を表す略号には含まれないものとして表示される。

[0243] 本発明において、糖鎖の基本単位となる単糖の記載は、別に定める場合を除き、便宜上、その環構造において、環を構成する酸素原子に結合し、且つ、水酸基（又はグリコシド結合に帰属する酸素原子）と直接結合した炭素原子を1位（シアル酸においてのみ2位）として表記する。実施例化合物の名称は、化学構造全体として付されたものであり、このルールは必ずしも適用されない。

[0244] 本発明において、糖鎖を記号（例えば、GLY、SG、MSG、GlcN

A c等)として記載する場合、別に定義される場合を除き、還元末端の炭素までを、当該記号に含めるものとし、N-又はO-グリコシド結合に帰属するN又はOは、当該記号には含まれないものとする。

[0245] 本発明において、特別な記載がない限り、アミノ酸の側鎖において糖鎖と連結した場合の部分構造は、側鎖部分を括弧で表示し、例えば、「(S G -) A s n」のように表記するものとする。

[0246] 本発明におけるA bの糖鎖は、N結合型糖鎖やO結合型糖鎖であり、好ましくは、N結合型糖鎖である。

[0247] N結合型糖鎖はNグリコシド結合、O結合型糖鎖はOグリコシド結合により、抗体のアミノ酸側鎖と結合している。

[0248] I g Gはその重鎖のF c領域における297番目のアスパラギン残基(以下、「A s n 297又はN 297」という。)によく保存されたN結合型糖鎖を有しており、抗体分子の活性や動態等に寄与することが知られている(B i o t e c h n o l . P r o g . , 2012, 28, 608-622、S a n g l i e r - C i a n f e r a n i , S . , A n a l . C h e m . , 2013, 85, 715-736)。

[0249] I g Gの定常領域におけるアミノ酸配列はよく保存されており、E d e l m a n e t a l . , (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , V o l . 63, No. 1 (May 15, 1969), pp. 78-85)において、それぞれのアミノ酸がE u番号(E u I N D E X)で特定されている。例えば、F c領域においてN結合型糖鎖が付加するA s n 297は、E u番号において297位に相当するものであり、分子の断片化や領域欠損によって実際のアミノ酸位置が変動した場合であってもE u番号で表示することによってアミノ酸が一義的に特定される。

[0250] 本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおいて、より好ましくは、抗体又はその機能性断片はそのA s n 297の側鎖に結合する糖鎖(以下、「N 297糖鎖」という)からLに結合しており、更に好ましくは、抗体又はその機能性断片は前記N 297糖鎖からLに結合しており、当該N 297糖鎖がリ

モデリングされた糖鎖である。

[0251] なお、当該リモデリングされた糖鎖を有する抗体を糖鎖リモデリング抗体という。

[0252] SGPはSialyl GlycoPeptideの略であり、N結合型複合糖鎖の代表的なものである。鶏卵の卵黄から、SGPは、例えば、WO 2011/0278681に記載の方法に従って単離、精製することができる。また、SGPの精製品が市販（東京化成（株）、（株）伏見製薬所）されており、購入することができる。SGの糖鎖部分において還元末端のGlcNAcが一つ欠損した糖鎖（以下、「SG(10)」）のみからなるジシアロオクタサッカリド（東京化成（株））などが市販されている。

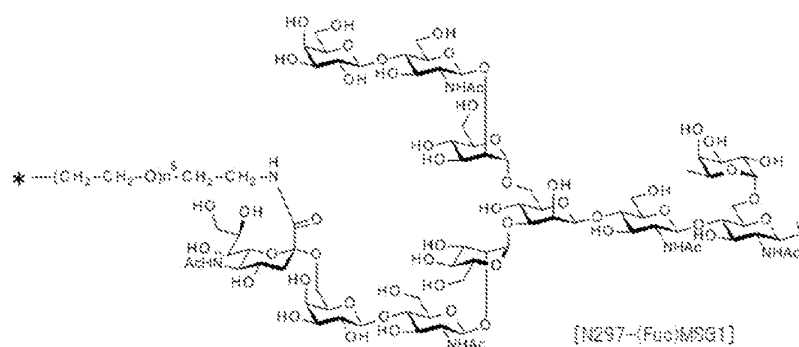
[0253] 本発明において、SG(10)の β -Manの分岐鎖のいずれか一方のみで非還元末端のシアル酸が欠失した糖鎖構造をMSG(9)といい、分岐鎖の1-3糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG1、分岐鎖の1-6糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG2、とそれぞれ表記するものとする。

[0254] 本発明のリモデリングされた糖鎖は、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはN297-(Fuc)MSG1とN297-(Fuc)MSG2の混合物、又はN297-(Fuc)SGであり、好ましくは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2又はN297-(Fuc)SGであり、より好ましくはN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2である。

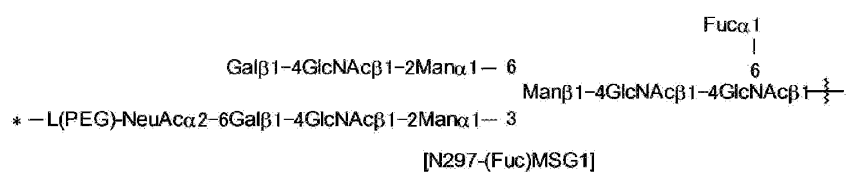
[0255] N297-(Fuc)MSG1は以下の構造式又は配列式で示される。

[0256]

[化44]



[0257] [化45]

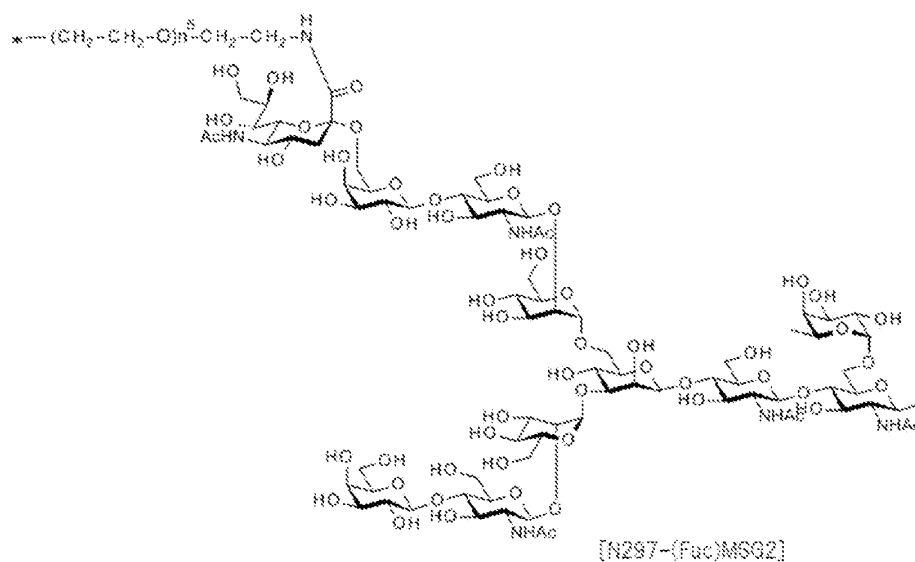


[0258] 上記式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、
 L (P E G) は、 $-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-NH-$ を示し、右
 端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-3 鎖側の非還元末
 端のシアル酸の2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、
 *は、前記リンカーL、特にリンカーLにおけるL b の1, 2, 3-トリア
 ザール環上の1 位又は3 位の窒素原子と結合していることを示し、
 ここで、 n は2~1 0 の整数であり、好ましくは、2~5 の整数である。

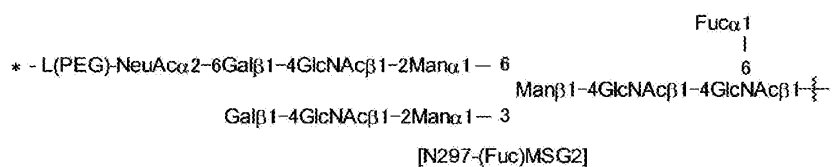
[0259] N 2 9 7 - (F u c) M S G 2 は以下の構造式又は配列式で示される。

[0260]

[化46]



[0261] [化47]

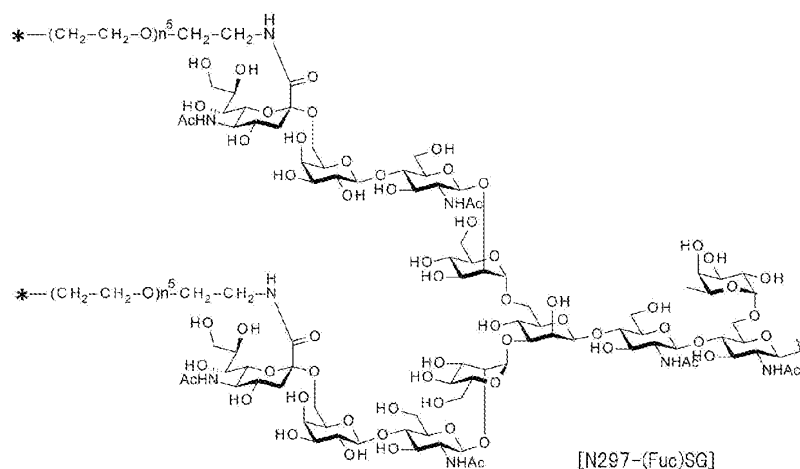


[0262] 上記式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、
 L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、右
 端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-6鎖側の非還元末
 端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、
 *は、前記リンカーL、特にリンカーLにおけるL b の1, 2, 3-トリア
 ザール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、
 ここで、 n^5 は2~10の整数であり、好ましくは、2~5の整数である。

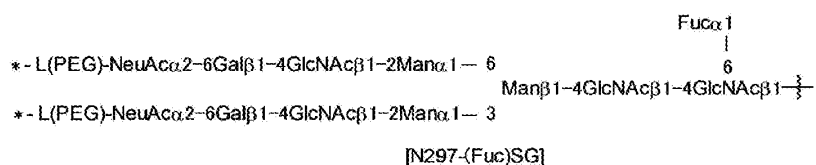
[0263] N 2 9 7 - (F u c) S G は以下の構造式又は配列式で示される。

[0264]

[化48]



[0265] [化49]



[0266] 上記式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-NH-$ を示し、右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β - M a n の分岐鎖の1 - 3 鎖側及び1 - 6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、* は、前記リンカーL、特にリンカーLにおけるL b の1, 2, 3 - トリアゾール環上の1 位又は3 位の窒素原子と結合していることを示し、

ここで、 n は2 ~ 1 0 の整数であり、好ましくは、2 ~ 5 の整数である。

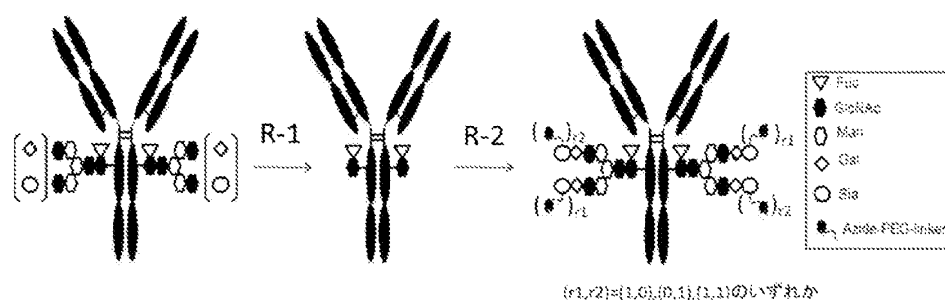
[0267] 本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体のN 2 9 7 糖鎖が、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1 もしくはN 2 9 7 - (F u c) M S G 2 又はそれらの混合物である場合、抗体は二量体であるため、抗体-薬物コンジュゲートは2 つのリンカーL 及び2 つの薬物D が結合された分子 (上記 $m^2 = 1$) と

なる。

[0268] <抗体の調製>

糖鎖リモデリング抗体、例えばWO2013/120066などに記載の方法に準じて、次式に示すような方法で製造することができる。

[0269] [化50]



[0270] R-1工程 還元末端のキトピオース構造のGlcNAcβ1-4GlcNAcの間のグリコシド結合の加水分解

本工程は目的の抗体に対して、公知の酵素反応を用いて抗体のアミノ酸配列297番目のアスパラギンに結合するN結合型糖鎖（N297結合糖鎖）を切断し、糖鎖切断抗体を調製する工程である。

[0271] 目的の抗体（20mg/ml）を緩衝溶液（50mMリン酸緩衝溶液等）中、0℃から40℃までにおいて、EndoS酵素等の加水分解酵素を用いて還元末端のキトピオース構造のGlcNAcβ1と4GlcNAcの間のグリコシド結合の加水分解反応を実施する。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。野生型EndoS酵素は抗体100mgに対して、0.1から10mg、好ましくは0.1から3mgを用いる。反応終了後、後述するアフィニティークロマトグラフィー精製及び／又はハイドロキシアパタイトカラム精製を実施することでGlcNAcβ1と4GlcNAcの間の糖鎖が加水分解された（Fucα1, 6）GlcNAc抗体を製造することができる。

[0272] R-2工程 糖鎖転移反応

本工程は上述の (Fuc α 1, 6)GlcNAc 抗体に対し、酵素反応を用いてアジド基を含むPEGリンカーを有するMSG (MSG1、MSG2) 又はSG型糖鎖オキサゾリン体 (以下、「アジド糖鎖オキサゾリン体」) を結合させ、糖鎖リモデリング抗体を製造する工程である。

[0273] 上記の糖鎖切断抗体を緩衝溶液 (リン酸緩衝溶液等) 中、0℃から40℃までにおいて、触媒量のEndoS (D233Q/Q303L) 等の糖転移酵素存在下、アジド糖鎖オキサゾリン体と反応させることで、糖鎖転移反応を実施する。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。EndoS酵素 (D233Q/Q303L) は抗体100mgに対して、1から10mg、好ましくは1から3mgを用い、アジド糖鎖オキサゾリン体は2から過剰当量、好ましくは2から20当量を使用する。

[0274] 反応終了後、アフィニティークロマトグラフィー精製とハイドロキシアパタイトカラム精製を実施することで精製した糖鎖リモデリング抗体を得ることができる。

[0275] アジド糖鎖オキサゾリン体は実施例11に記載の方法に従い調製できる。MSG1に有機合成科学分野で公知の反応 (縮合反応等) を利用して、アジド基を含むPEGリンカー (N₃-L (PEG)) であるN₃-(CH₂CH₂-O)_n-CH₂CH₂-NH₂を導入することができる。すなわち、シアル酸2位へのカルボン酸とN₃-(CH₂CH₂-O)_n-CH₂CH₂-NH₂の右末端のアミノ基が縮合反応によりアミド結合を形成する。

[0276] 縮合反応を用いる場合、縮合剤としては、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDCI)、カルボニルジイミダゾール (CDI)、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル) フェノール (BOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロりん酸塩 (PyBOP)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロりん酸塩 (HATU) 等を、反

応に用いられる溶媒としては、ジクロロメタン、DMF、THF、酢酸エチル等、または、これらの混合溶媒が挙げられるが、特に限定されない。

[0277] 反応温度は、通常 -20°C から 100°C もしくは溶媒の沸点までの範囲であるが、好ましくは -5°C から 50°C までの範囲である。また、必要に応じてトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリンまたは4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基、または炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基を添加することができる。さらに、1-ドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシスクシンイミド等を反応促進剤として添加することも可能である。

[0278] なお、MSG1は、分離精製した(MSG1-)Asn(実施例11)をEndoM等の加水分解酵素で加水分解することにより得ることができる。

[0279] オキサゾリン化はMSG1の還元末端のGlcNAcから、公知の論文(J. Org. Chem., 2009, 74(5), 2210-2212; Helv. Chim. Acta, 2012, 95, 1928-1936.)に従い調製できる。

[0280] N297糖鎖の加水分解反応に用いる酵素としては、EndoS又はその加水分解活性を保持した変異酵素などを用いることができる。

[0281] 上記の加水分解反応により得られた(Fuc α 1,6)GlcNAc-抗体を糖鎖アクセプター分子として、EndoS D233Q又はEndoS D233Q/Q303L変異体のような糖転移酵素(WO2017010559等)を用いてMSG(MSG1、MSG2)又はSG型糖鎖ドナー分子と反応させることによって、上述の構造からなるMSG(MSG1、MSG2)又はSG型N297糖鎖を有する抗体を得ることができる。

[0282] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数 m^2 が1の場合、糖鎖としてMSG、MSG1又はMSG2を有する糖鎖ドナー分子を採用する。このような糖鎖は、市販のmonosialo-Asn free(1S2G/1G2S-10NC-Asn、(株)糖鎖工学研究所、以下、「(MSG-)Asn」と言う)を原料に実施例11に記載の方法に準

じて (MSG1-)Asn 又は (MSG2-)Asn を分離して採用することもできるし、分離せずに混合物として採用することもできる。

- [0283] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体 1 分子あたりの薬物結合数 m^2 が 2 の場合、この糖転移反応には糖鎖として SG(10) を有する糖鎖ドナー分子を用いる。このような SG(10) 糖鎖は、例えば SGP から加水分解等によって取得されたものを用いても良く、市販のジシアロオクタサッカリド (東京化成工業 (株)) のような SG(10) 糖鎖を用いてもよい。
- [0284] ドナー分子に含まれる MSG (MSG1、MSG2) 又は SG 型糖鎖はそのシアル酸の 2 位にアジド基を含む PEG リンカー ($N_3-L(PEG)$) を有する。シアル酸の 2 位へのアジド基を含む PEG リンカー ($N_3-L(PEG)$) の導入には、MSG (MSG(9))、MSG1 もしくは MSG2 又はジシアロオクタサッカリド (SG(10)) とアジド基を含む PEG リンカー ($N_3-L(PEG)$) である $N_3-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-NH_2$ (n は 2~10 の整数であり、好ましくは、2~5 の整数を示す。) を有機合成科学分野で公知の反応 (縮合反応等) を利用することができる。すなわち、シアル酸 2 位へのカルボン酸と $N_3-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-NH_2$ の右末端のアミノ基が縮合反応によりアミド結合を形成する。
- [0285] また、MSG (MSG1、MSG2) 又は SG 型糖鎖は、例えば α -アミノ基が保護あるいは修飾されていてもよい (MSG1-)Asn、(MSG2-)Asn 又は (SG-)Asn (糖鎖工学研究所) 等の原料のシアル酸の 2 位のカルボン酸及び前記 Asn のカルボン酸に縮合反応を利用してアジド基を有する PEG リンカー ($N_3-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-NH_2$) を導入し、EndoM や EndoRp のような加水分解酵素を作用させて得ることもできる。 α -アミノ基の保護基としてはアセチル (Ac) 基、*t*-Butoxycarbonyl (Boc) 基、ベンゾイル (Bz) 基、ベンジル (Bzl) 基、Carbobenzoxy (Cbz) 基、9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 基等が挙

げられるが、これに限らない。 α -アミノ基の保護基は、好ましくは、Fmoc基である。

[0286] α -アミノ基の修飾基としてはヒドロキシアセチル基、又はPEG構造等を有する水溶性を向上させる修飾基を挙げることができる。

[0287] (MSG1)-Asn、(MSG2)-Asn又は(SG)-Asnは、好ましくは、 α -アミノ基が前記保護基で保護されている。 α -アミノ基が保護基（例えば、Fmoc基）で保護されている場合、必要に応じ、アジド基を有するPEGリンカーを導入した後、加水分解酵素を作用させる前に保護基を除去することができる。

[0288] 分子に含まれるMSG (MSG1、MSG2) 又はSG型糖鎖の還元末端のGlcNAcは、例えば2-クロロ-1, 3-ジメチル-1H-ベンズイミダゾール-3-イウムクロライド処理によるオキサゾリン化のような形で活性化されたものを用いることが好ましい。

[0289] 糖転移反応に用いる酵素（糖転移酵素）としては、N297糖鎖に複合型糖鎖を転移させる活性を有するものであれば様々なものが採用できるが、好ましいものはEndoSの233番目のAspをGlnに置換することで加水分解反応を抑制した改変体であるEndoS D233Qである。EndoS D233Qを用いた糖転移反応については、WO2013/120066などに記載されている。また、EndoS D233Qに対して、さらに変異を加えたEndoS D233Q/Q303Lのような改変体酵素（WO2017010559）を利用してもよい。

[0290] 抗体の糖鎖リモデリング（糖加水分解、及び糖鎖転移反応）後の抗体の精製操作は、反応に使用した低分子化合物及び酵素との分離を目的とし、このような精製には、通常、ゲルろ過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などが使用されるが、更にヒドロキシアパタイトカラムによる追加精製を行ってもよい。すなわち、本発明は、抗体の糖加水分解後の反応液からの中間体の精製工程において、更にヒドロキシアパタイトカラムによる精製工程を含む、薬物-コンジュ

ゲート体の製造方法を提供する。糖鎖リモデリング報告例 (J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308-12318, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367) に従うと、抗体を加水分解酵素で処理した反応液をプロテインAカラム (アフィニティークロマトグラフィーカラム) で精製するのみであるが、この精製方法では、加水分解酵素 (Endo S等) が完全には除去できず、残留酵素が影響して、次の糖転移反応に影響を与えることが判明した。ここで、精製法を検討した結果、抗体を加水分解酵素で処理した反応液をプロテインAカラム、ハイドロキシアパタイトカラム (CHTカラム、Bio-Rad Laboratories, Inc.) の順に精製することによって、残留酵素の影響なく、次の糖鎖転移反応の反応効率が向上した。

[0291] 上記の糖鎖リモデリング抗体の調製において、抗体水溶液の濃縮、濃度測定、バッファー交換は以下の共通操作A乃至Cに従って行うことができる。

[0292] (共通操作A: 抗体水溶液の濃縮)

Amicon Ultra (30,000乃至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4000Gで5乃至20分間遠心) にて、抗体および後述する抗体-薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

[0293] (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 ($1.3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 乃至 $1.8 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いた。

[0294] (共通操作C: 抗体のバッファー交換)

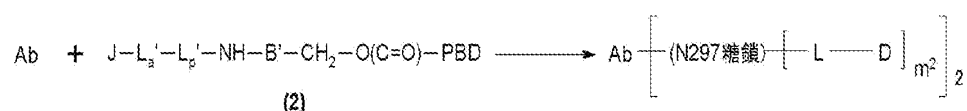
抗体水溶液は緩衝溶液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0)、リン酸緩衝

液（pH 6.0）等）を加え共通操作Aを用いて濃縮した。この操作を数回行った後、共通操作Bを用いて抗体濃度の測定を行い、緩衝溶液（リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）、リン酸緩衝液（pH 6.0）等）を用いて10 mg/mLに抗体濃度を調整した。

[0295] <コンジュゲーション>

本製造法は、上述の糖鎖リモデリング抗体と製造中間体（2）をSPAAC（strain-promoted alkyne azide cycloaddition：J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 15046-15047）反応により結合させ、抗体-薬物コンジュゲートを製造する方法である。

[0296] [化51]



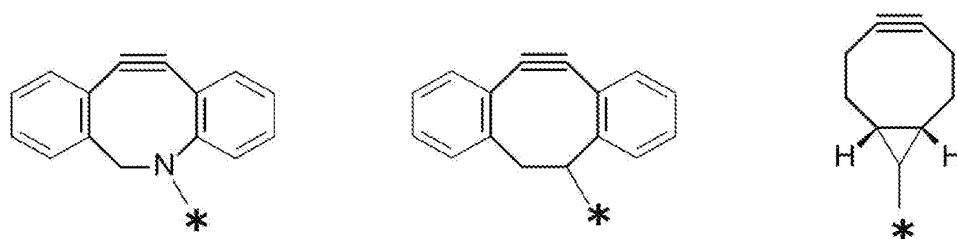
[0297] 式中Abは糖鎖リモデリング抗体を示し、

L_{a}' 、 L_{p}' 、 B' は、 L_{a} 、 L_{p} 、 B と同義であり、

Jは、以下で示されるいずれかの構造式を示し、

式中、アスタリスクは L_{a}' と結合していることを示す。

[0298] [化52]



[0299] $\text{J}-\text{L}_{\text{a}}'-\text{L}_{\text{p}}'-\text{NH}-\text{B}'-\text{CH}_2-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{PBD}$ は実施例10-1～10-6に記載の方法等により合成することができる。

[0300] 抗体Abの緩衝溶液（酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム溶液等またはそれらの混合物）と、化合物（2）を適当な溶媒（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)、プロピレングリコール (PG) 等またはそれらの混合物) に溶解させた溶液を混合することで、SPAAC反応は進行する。

[0301] 抗体1モルに対し、化合物(2)は2モルから過剰モル、好ましくは1モルから30モルであり、有機溶媒の比率は、抗体の緩衝液に対し1乃至20% v/vが好ましい。反応温度は0℃乃至37℃、好ましくは10℃から25℃であり、反応時間は1から150時間、好ましくは6時間から100時間である。反応時のpHは5乃至9が好ましい。

[0302] 抗体-薬物コンジュゲートは、前述の共通操作A乃至Cおよび後述の共通操作D乃至Fによってバッファー交換、精製、抗体濃度、及び抗体一分子あたりの平均薬物結合数(DAR: Drug to Antibody Ratio)の測定を行い、抗体-薬物コンジュゲート化合物(ADC)の同定を行うことができる。

[0303] (共通操作D: 抗体-薬物コンジュゲートの精製)

市販のSorbitol (5%) を含む酢酸緩衝液 (10mM, pH 5.5; 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1.5~2.5mL) 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ジメチルスルホキシド、プロピレングリコールを除いた抗体-薬物コンジュゲートを得た。必要に応じて、共通操作AおよびCにより抗体-薬物コンジュゲート溶液の濃度を調製した。

[0304] (共通操作E: 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度の測定)

抗体-薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、下記に示すランベルト・ベールの法則を用いて、算出することができる。

以下にランバルトベールの法則を用いた式(1)を示す。

[0305] [数1]

$$\begin{aligned} A_{280} &= \varepsilon_{280}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot l(\text{cm}) & \text{式(I)} \\ \text{吸光度} &= \text{モル吸光係数} \times \text{モル濃度} \times \text{光路長} \end{aligned}$$

[0306] ここで、 A_{280} は抗体-薬物コンジュゲート水溶液の280nmにおける吸光度を示し、 ε_{280} は抗体-薬物コンジュゲートの280nmにおけるモル吸光係数を示し、 $C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ は抗体-薬物コンジュゲートのモル濃度を示す。

上記式(1)より抗体-薬物コンジュゲートのモル濃度 $C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ は以下の式(11)で求められる。

[0307] [数2]

$$C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A_{280}}{\varepsilon_{280}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l(\text{cm})} \quad \text{式(II)}$$

[0308] さらに両辺に抗体-薬物コンジュゲートのモル質量 $MW(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})$ を掛けることで、抗体-薬物コンジュゲートの重量濃度 $C'(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ を求めることができる(式(111))。

[0309] [数3]

$$C'(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = MW(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}) \cdot C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A_{280} \cdot MW(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})}{\varepsilon_{280}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l(\text{cm})} \quad \text{式(III)}$$

[0310] 以下に、上記式に用いて本実施例に適用した各値について記載する。

[0311] 吸光度 A_{280} は、抗体-薬物コンジュゲート水溶液の280nmにおけるUV吸光度の実測値を用いた。モル質量 $MW(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})$ は抗体のアミノ酸配列からより求められる抗体分子量の計算推定値を抗体-薬物コンジュゲートのモル質量の近似値として用いている。光路長 $l(\text{cm})$ は1cmで測定した。

抗体薬物コンジュゲートのモル吸光係数 ε_{280} は、以下の式(1V)によって求めることができる。

[0312] [数4]

$$\varepsilon_{280} = \text{抗体モル吸光係数 } \varepsilon_{Ab, 280} + \text{薬物モル吸光係数 } \varepsilon_{DL, 280} \times \text{薬物結合数} \quad \text{式(IV)}$$

[0313] ここで、 $\varepsilon_{Ab, 280}$ は280nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、 $\varepsilon_{DL, 280}$ は280nmにおける薬物のモル吸光係数を示す。

$\varepsilon_{Ab, 280}$ 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値を用いた。実施例において、H01L02抗体のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{Ab, 280} = 223400$ （計算推定値）を用いた。H01L02A抗体のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{Ab, 280} = 223674$ （計算推定値）、H31L02A抗体のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{Ab, 280} = 223314$ （計算推定値）、H11L02A抗体のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{Ab, 280} = 220490$ （計算推定値）、LPS抗体のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{Ab, 280} = 230300$ （計算推定値）を用いた。

$\varepsilon_{DL, 280}$ は、都度UV測定で得た実測値より算出したものを使用した。すなわち、コンジュゲート前駆体（薬物）をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定し、ランベルト・ベールの法則、式（I）を適用することで得られる値を使用した。

[0314] （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平均薬物結合数の測定）

抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの平均薬物結合数は、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析によって求めることができる。

[0315] （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。

[0316] (F-2. HPLC分析)

HPLC分析を、下記の測定条件にて行う。

[0317] 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: 280 nm、329 nm)

カラム: BEH Phenyl (2.1 × 50 mm、1.7 μm、Waters Acquity)

カラム温度: 75 °C

移動相A: 0.1 %トリフルオロ酢酸 (TFA), 15 %イソプロピルアルコール水溶液

移動相B: 0.075 % TFA、15 %イソプロピルアルコールアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム: 14 % - 36 % (0分 - 15分)、36 % - 80 % (15 - 17分)、80 % - 14 % (17分 - 17.1分)、14 % - 14 % (17.1分 - 23分)

サンプル注入量: 5 μL

(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H鎖 (薬物が一つ結合したH鎖: H_1 、薬物が一つ結合したH鎖: H_2) は、結合した薬物の数に比疎水性が増して保持時間が大きくなることから、 L_0 、 H_0 、 H_1 、 H_2 の順に溶出されることから 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 、 H_0 、 H_1 、 H_2 のいずれかに割り当てることができる。また薬物が結合しているかは、薬物の特徴的な329 nmの波長吸収でも確認できる。

[0318] (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、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。

[0319] [数5]

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

[0320] 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た。H01L02抗体の場合、そのアミノ酸配列に従って、H鎖のモル吸光係数として81480を推定値として用いた。同様に、H01L02A抗体の場合、H鎖のモル吸光係数として79829を、H31L02A抗体の場合、H鎖のモル吸光係数として80131を、H11L02A抗体の場合、H鎖のモル吸光係数として78696を、LPS抗体の場合、H鎖のモル吸光係数として77470を、薬物リンカーのモル吸光係数（280nm）は、コンジュゲート前駆体である薬物リンカー1-4の実測のモル吸光係数（280nm）を用いた。

[0321] (F-3-3) ピーク面積補正值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。

[0322] [数6]

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

A_{Hi} : H_i 各々のピーク面積補正值

[0323] (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平均薬物結合数を、下式に従って計算する。

[0324] [数7]

$$\text{平均薬物結合数} = (\text{H}_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + \text{H}_1 \text{ピーク面積比} \times 1 + \text{H}_2 \text{ピーク面積比} \times 2) / 100 \times 2$$

[0325] 4. 医薬

上記、「2. 抗CDH6抗体の製造」の項及び実施例に記載された本発明

の抗CDH6抗体及び当該抗体の機能性断片は、腫瘍細胞表面のCDH6に結合し、内在化活性を有することから、単独であるいは他の薬剤と組み合わせて、医薬として、腎細胞腫瘍及び卵巣腫瘍等のがん、例えば、腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌又は非小細胞肺癌）、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫の治療剤として用いることができる。

- [0326] また、CDH6を発現している細胞の検出に用いることができる。
- [0327] 更に、本発明の抗CDH6抗体及び当該抗体の機能性断片は、内在化活性を有することから、抗体－薬物コンジュゲートに用いる抗体として供することができる。
- [0328] 上記「3. 抗CDH6抗体－薬物コンジュゲート」の項及び実施例に記載の本発明の抗CDH6抗体－薬物コンジュゲートのうちで薬物として細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物が用いられているものは、内在化活性を有する抗CDH6抗体及び／又は当該抗体の機能性断片と細胞傷害活性等の抗腫瘍活性を有する薬物のコンジュゲートであり、CDH6を発現しているがん細胞に対して抗腫瘍活性を示すことから、医薬として、特にがん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。
- [0329] 本発明の抗CDH6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したりすることにより、水分を吸収し、あるいは吸着水が付着するなどして、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物又は薬理学的に許容され得る塩も本発明に包含される。
- [0330] 本発明の抗CDH6抗体－薬物コンジュゲートが、アミノ基などの塩基性基を有する場合、所望により薬理学的に許容され得る酸付加塩を形成することができる。そのような酸付加塩としては、例えばフッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルカンスルホン酸

塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などのアリールスルホン酸塩；蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；又はオルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などのアミノ酸塩などを挙げることができる。

[0331] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートが、カルボキシ基などの酸性基を有する場合、所望により薬理学的に許容され得る塩基付加塩を形成することができる。そのような塩基付加塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩などの無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-N-(2-フェニルエトキシ)アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。

[0332] 本発明はまた、抗体-薬物コンジュゲートを構成する原子の1以上が、その原子の同位体で置換された抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートを包含し得る。同位体には放射性同位体及び安定同位体の2種類が存在し、同位体の例としては、例えば、水素の同位体(^2H 及び ^3H)、炭素の同位体(^{11}C 、 ^{13}C 及び ^{14}C)、窒素の同位体(^{13}N 及び ^{15}N)、酸素の同位体(^{15}O 、 ^{17}O 及び ^{18}O)、フッ素の同位体(^{18}F)などを挙げることができる。同位体で標識された抗体-薬物コンジュゲートを含む組成物は、例えば、治療剤、予防剤、研究試薬、アッセイ試薬、診断剤、インビボ画像診断剤などとして有用である。同位体で標識された抗体-薬物コンジュゲート、及び、同位体で標識された抗体-薬物コンジュゲートの任意の割合の混合物もすべて本発明に包含される。同位体で標識された抗体-薬物コンジュゲートは、当該分

野で公知の方法により、例えば、後述する本発明の製造方法における原料の代わりに同位体で標識された原料を用いることにより、製造することができる。

[0333] *in vitro*での殺細胞活性は例えば、細胞の増殖抑制活性で測定することができる。例えば、CDH6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CDH6抗体－薬物コンジュゲートを添加し、フォーカス活性、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。ここで、例えば、腎細胞腫瘍及び卵巢腫瘍由来がん細胞株等を用いることで、腎細胞腫瘍及び卵巢腫瘍に対する細胞増殖抑制活性を調べることができる。

[0334] *in vivo*での実験動物を用いたがんに対する治療効果は、例えば、CDH6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CDH6抗体－薬物コンジュゲートを投与し、がん細胞の変化を測定することができる。ここで、例えば、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巢癌、卵巢漿液性腺癌又は甲状腺癌由来の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いることで、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巢癌、卵巢漿液性腺癌又は甲状腺癌に対する治療効果を測定することができる。

[0335] 本発明の抗CDH6抗体－薬物コンジュゲートが適用されるがんの種類としては、治療対象となるがん細胞においてCDH6を発現しているがんであれば特に制限されないが、例えば、腎細胞癌（例えば、腎淡明細胞癌又は乳頭状腎細胞癌）、卵巢癌、卵巢漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌又は非小細胞肺癌）、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫を挙げることができるが、CDH6を発現している限りこれらに制限されない。より好ましいがんの例としては、腎細胞癌（例えば、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌）又は卵巢癌を挙げることができる。

[0336] 本発明の抗CDH6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。

- [0337] 本発明の抗CDH6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。
- [0338] 本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、1種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、1種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水及び油（石油、動物、植物、又は合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など）を含む））を含む。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液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、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、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。
- [0339] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗CDH6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、及び皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入又はボ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、上記抗体-薬物コンジュゲートの投与は、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。
- [0340] 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など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予定である場合、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。

[0341] 本発明の医薬組成物には本願の抗CDH6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CDH6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がん治療剤を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗CDH6抗体-薬物コンジュゲートは、他のがん治療剤と共に投与することもでき、これによって抗がん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がん剤は、抗体-薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このようながん治療剤として、Imatinib、Sunitinib、Regorafenibなどを含むチロシンキナーゼ阻害剤、Palbociclibなどを含むCDK4／6阻害剤、TAS-116などを含むHSP90阻害剤、MEK162などを含むMEK阻害剤、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、イピリムマブなどを含む免疫チェックポイント阻害剤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。

[0342] このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

[0343] 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CDH6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（ K_d 値）の点において、親和性が高い（ K_d 値が低い）ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体-薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体-薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体-薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約0.001～100mg/kgを1回あるいは1～180日間に1回の間隔で複数回投与すればよい。好適には、0.1～50mg/kgを、さらに好適には、1～50mg/kg、1～30mg/kg、1～20mg/kg、1～15mg/kg、2～50mg/kg、2～30mg/kg、2～20mg/kg又は2～15mg/kgを1～4週間に1回、好ましくは2～3週間に1回の間隔で複数回投与すればよい。

実施例

[0344] 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。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Molecular Cloning）」（Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及びManiatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年発刊）に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。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。

[0345] [実施例1：内在化活性を有するラット抗ヒトCDH6抗体の取得]

1) -1 ヒトおよびカニクイザルCDH6発現ベクターの構築

ヒトCDH6タンパク質（NP_004923）をコードするcDNA発

現ベクター (OriGene社、RC217889) を用いて、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってヒトCDH6発現ベクターpcDNA3.1-hCDH6が作製された。ヒトCDH6 ORF (Open Reading Frame) のアミノ酸配列を配列番号1に示す。

[0346] カニクイザルCDH6タンパク質をコードするcDNAは、カニクイザル腎臓のtotal RNAより合成したcDNAを鋳型にprimer 1 (5'-CACCATGAGAACTTACCGCTACTTCTTGCTGCTC-3') (配列番号8) 及びprimer 2 (5'-TTAGGAGTCTTTGTCACTGTCCACTCCTCC-3') (配列番号9) を用いてクローニングを行った。得られた配列が、カニクイザルCDH6 (NCBI, XP_005556691.1) の細胞外領域と一致することを確認した。また、EMBLで登録されたカニクイザルCDH6 (EHH54180.1) と全長配列が一致することを確認した。当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターに組み込むことによってカニクイザルCDH6発現ベクターpcDNA3.1-cynoCDH6が作製された。カニクイザルCDH6 ORFのアミノ酸配列を配列番号7に示す。

[0347] 作製したプラスミドDNAの大量調製は、EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN) を用いて行った。

[0348] 1) - 2 免疫

免疫にはWKY/Izmラットの雌 (日本エスエルシー社) を使用した。まずラット両足下腿部をHyaluronidase (SIGMA-ALDRICH社) にて前処理後、同部位に実施例1) - 1で作製したヒトCDH6発現ベクターpcDNA3.1-hCDH6を筋肉内注射した。続けて、ECM830 (BTX社) を使用し、2ニードル電極を用いて、同部位にインビボエレクトロポレーションを実施した。約二週間に一度、同様のインビボエレクトロポレーションを繰り返した後、ラットのリンパ節又は脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

[0349] 1) - 3 ハイブリドーマ作製

リンパ節細胞あるいは脾臓細胞とマウスミエローマSP2/O-ag14細胞(ATCC, No. CRL-1581)とをLF301 Cell Fusion Unit(BEX社)を用いて電気細胞融合した後、ClonaCell-HY Selection Medium D(Stem Cell Technologies社)に懸濁し、希釈して37℃、5% CO₂の条件下で培養した。出現した各々のハイブリドーマコロニーは、モノクローンとして回収され、ClonaCell-HY Selection Medium E(Stem Cell Technologies社)に懸濁して37℃、5% CO₂の条件下で培養した。適度に細胞が増殖した後、各々のハイブリドーマ細胞の凍結ストックを作製すると共に、得られたハイブリドーマ培養上清を抗ヒトCDH6抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングに用いた。

[0350] 1) - 4 Cell-ELISA法による抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

1) - 4 - 1 Cell-ELISA用抗原遺伝子発現細胞の調製

293 α 細胞(インテグリン α v及びインテグリン β 3を発現するHEK293由来の安定発現細胞株)を10% FBS含有DMEM培地中5 $\times$ 10⁵細胞/mLになるよう調製した。Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific社)を用いた形質移入手順に従って、この293 α 細胞に対して、pcDNA3.1-hCDH6もしくはpcDNA3.1-cynoCDH6または、陰性コントロールとしてpcDNA3.1のDNAを導入し、96-well plate(Corning社)に100 μ Lずつ分注後、10% FBS含有DME M培地中で37℃、5% CO₂の条件下で24から27時間培養した。得られた形質移入細胞を接着状態のまま、Cell-ELISAに使用した。

[0351] 1) - 4 - 2 Cell-ELISA

実施例1) - 4 - 1で調製した発現ベクター導入293 α 細胞の培養上清

を除去後、p c D N A 3. 1 - h C D H 6もしくはp c D N A 3. 1 - c y n o C D H 6またはp c D N A 3. 1 導入293 α 細胞の各々に対しハイブリドーマ培養上清を添加し、4℃で1時間静置した。w e l l中の細胞を5% FBS含有PBS (+)で1回洗浄後、5% FBS含有PBS (+)で500倍に希釈したA n t i - R a t I g G - P e r o x i d a s e a n t i b o d y p r o d u c e d i n r a b b i t (S I G M A社)を加えて、4℃で1時間静置した。w e l l中の細胞を5% FBS含有PBS (+)で3回洗浄した後、OPD発色液(OPD溶解液(0.05 M クエン酸3ナトリウム、0.1 M リン酸水素2ナトリウム・12水 pH4.5)にo-フェニレンジアミン二塩酸塩(和光純薬社)、H₂O₂をそれぞれ0.4 mg/mL、0.6% (v/v)になるように溶解)を100 μ L/w e l lで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、1 M H C lを100 μ L/w e l lで添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー(ENVISION:PerkinElmer社)で490 nmの吸光度を測定した。コントロールのp c D N A 3. 1 導入293 α 細胞と比較し、p c D N A 3. 1 - h C D H 6ならびにp c D N A 3. 1 - c y n o C D H 6発現ベクター導入293 α 細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマをヒト、かつ、カニクイサルCDH6に結合する抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

[0352] 1) - 5 フローサイトメトリーによるカニクイサルCDH6への選択的結合抗体のスクリーニング

1) - 5 - 1 フローサイトメトリー解析用抗原遺伝子発現細胞の調製

293 T細胞を5 $\times$ 10⁴細胞/cm²になるよう225 cm²フラスコ(住友ベークライト社)に播種し、10% FBS含有DMEM培地中で37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。この293 T細胞に、p c D N A 3. 1 - c y n o C D H 6または、陰性コントロールとしてp c D N A 3. 1 をL i p o f e c t a m i n e 2000を用いて導入し、37℃、5% CO₂の条件下でさらに一晩培養した。各ベクターを導入した293 T細胞を

TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific社) で処理し、10% FBS含有DMEMで細胞を洗浄した後、5% FBS含有PBSに懸濁した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメトリー解析に使用した。

[0353] 1) -5-2 フローサイトメトリー解析

実施例1) -4のCell-ELISAで選択されたヒト、かつ、カニクイサルCDH6に結合する抗体産生ハイブリドーマが産生する抗体のカニクイサルCDH6に対する結合特異性をフローサイトメトリー法によりさらに確認した。実施例1) -5-1で調製した一過性発現293T細胞の懸濁液を遠心し、上清を除去した後、各々に対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したAnti-Rat IgG FITC conjugate (SIGMA社) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、2 μ g/mL 7-aminoactinomycin D (Molecular Probes社) を含む5% FBS含有PBSに再懸濁し、フローサイトメーター (FC500: Beckman Coulter社) で検出した。データ解析はFlowJo (TreeStar社) で行った。7-aminoactinomycin D陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のFITC蛍光強度のヒストグラムを作成した。コントロールであるpcDNA3.1導入293T細胞の蛍光強度ヒストグラムに対しpcDNA3.1-cynoCDH6導入293T細胞のヒストグラムが強蛍光強度側にシフトしている抗体を産生するハイブリドーマを細胞膜表面上に発現するカニクイサルCDH6に特異的に結合する抗体産生ハイブリドーマとして選択した。

[0354] 1) -6 ラットモノクローナル抗体のアイソタイプの決定

実施例1) -5で選択したラット抗CDH6抗体産生ハイブリドーマの中から、ヒトならびにサルCDH6に強く特異的に結合することが示唆されたクローンrG019を選抜し、各抗体のアイソタイプを同定した。抗体の

重鎖のサブクラス、軽鎖のタイプは、RAT MONOCLONAL ANTIBODY ISOTYPING TEST KIT (DSファーマバイオメディカル社) により決定された。その結果、rG019のサブクラスは、IgG2b、タイプは κ 鎖であることが確認された。

[0355] 1) -7 ラット抗CDH6抗体の調製

1) -7-1 培養上清作製

ラット抗ヒトCDH6モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養上清から精製した。まず、ラット抗CDH6モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをClonaCell-HY Selection Medium E (StemCell Technologies社) で充分量まで増殖させた後、Ultra Low IgG FBS (Thermo Fisher Scientific社) を20%添加したHybridoma SFM (Thermo Fisher Scientific社) に培地交換し、4-5日間培養した。本培養上清を回収し、 $0.8\mu\text{m}$ のフィルターに通した後、さらに $0.2\mu\text{m}$ のフィルターに通して不溶物を除去した。

[0356] 1) -7-2 ラット抗CDH6抗体の精製

実施例1) -7-1で作製したハイブリドーマの培養上清からラット抗CDH6抗体rG019をProtein Gアフィニティークロマトグラフィーで精製した。Protein Gカラム (GE Healthcare Bioscience社) に抗体を吸着させ、PBSでカラムを洗浄後に 0.1M グリシン/塩酸水溶液 (pH2.7) で溶出した。溶出液に 1M Tris-HCl (pH9.0) を加えてpH7.0~7.5に調整した後、Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF30K、Sartorius社) にてHBSo (25mM ヒスチジン/5% ソルビトール、pH6.0) へのバッファー置換を行うとともに抗体の濃縮を行い、抗体濃度を 1mg/mL に調製した。最後にMinisart-Plus filter (Sartorius社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0357] [実施例2：ラット抗CDH6抗体の*in vitro*評価]

2) - 1 フローサイトメトリーによるラット抗CDH6抗体の結合能評価

実施例1) - 7で作製したラット抗CDH6抗体のヒトCDH6結合性をフローサイトメトリー法により評価した。実施例1) - 1で作製したpcDNA3.1-hCDH6を293T細胞(ATCC)にLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、TrypLE Express(Thermo Fisher Scientific社)で処理し細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した293T細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例1) - 7で調製したラット抗CDH6モノクローナル抗体rG019又はラットIgGコントロール(R&D Systems)を終濃度10ng/mL加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで50倍に希釈したAnti-Rat IgG(whole molecule)-FITC antibody produced in rabbit(SIGMA)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター(FC500:Beckman Coulter)で検出を行った。データ解析はFlowJo(TreeStar)で行った。その結果を図1に示す。図1のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムはhCDH6を導入していない陰性コントロール293T細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、hCDH6導入293T細胞を用いた場合を示す。細胞表面のhCDH6に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。ラットIgGコントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、作製したラット抗CDH6モノクローナル抗体4種はpcDNA3.1-hCDH6導入293T細胞に結合することを確認した。

[0358] 2) - 2 フローサイトメトリーによるラット抗CDH6抗体のCDH6結合部位の解析

2) - 2 - 1 ヒトCDH6各ドメイン欠失体発現ベクターの構築

ヒトCDH6の細胞外全長には5つの細胞外ドメイン、EC1（配列番号2）、EC2（配列番号3）、EC3（配列番号4）、EC4（配列番号5）、EC5（配列番号6）が存在する。ヒトCDH6全長から、5つのECドメインを各一箇所ずつ欠失発現した遺伝子をGeneArt社で合成し、当業者に公知な方法に従い哺乳動物発現用ベクターp3xFLAG-CMV-9ベクター（SIGMA-ALDRICH社）へ組み込み、EC1からEC5をそれぞれ欠失した、各ドメイン欠失体発現ベクターを作製した。

[0359] 2) - 2 - 2 フローサイトメトリーによるドメイン欠失体を用いたラット抗CDH6抗体のエピトープ解析

各ECドメイン欠失ベクターを導入した293 α 細胞株を用いたフローサイトメトリー解析により、ラット抗ヒトCDH6抗体の結合エピトープを同定した。インテグリン α vおよびインテグリン β 3発現ベクターをHEK293細胞内に安定形質移入した細胞株293 α 細胞株に対して、実施例2) - 2 - 1で作成した各ドメイン欠失体発現ベクター、及び全長ヒトCDH6を発現するpcDNA3.1-hCDH6をLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific 社) で処理し細胞懸濁液を調製した。導入293 α 細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例1) - 7で調製したrG019) 又はラットIgGコントロール (R&D Systems) を終濃度20nMで加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで50倍に希釈したAnti-Rat IgG (whole molecule) - FITC antibody produced in rabbit (SIGMA) を加えて懸濁し、4℃で1時間

静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター (Cantoll: BD Biosciences) で検出を行った。データ解析はFlowJo (TreeStar) で行った。その結果を図2-1及び図2-2に示す。図2-1及び図2-2のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは遺伝子を導入していない陰性コントロール293 α 細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、全長hCDH6又は各ECドメイン欠失293細胞を用いた場合を示す。細胞表面の全長hCDH6又は各ECドメイン欠失体に抗体が結合した場合は、蛍光強度が増強する。ラットIgGコントロールはいずれの導入細胞にも結合しない。rG019は、全長hCDH6、EC1欠失体、EC2欠失体、EC4欠失体、及びEC5欠失体には結合するが、EC3欠失体には結合しない。この結果から、rG019はhCDH6のEC3をエピトープとして特異的に結合することが示された。

[0360] 2) -3 ヒト腫瘍細胞株におけるCDH6の発現確認

取得抗体の評価に用いるCDH6陽性ヒト腫瘍細胞株を選抜するため、公知データベースからCDH6発現情報を検索し、フローサイトメトリー法により細胞膜表面でのCDH6の発現を評価した。ヒト卵巣腫瘍細胞株NIH: OVCAR-3、PA-1、OV-90及びヒト腎細胞腫瘍細胞株786-O、Caki-1 (全てATCCから入手) を37℃、5% CO₂の条件下で培養した後、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific社) で処理し、細胞懸濁液を調製した。細胞を遠心し、上清を除去した後、市販抗ヒトCDH6抗体 (MABU2715, R&D Systems) 又は陰性コントロールとしてマウスIgG1 (BD Pharmingen) を終濃度50ug/mL加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで50倍に希釈したF(ab')₂ Fragment of FITC-conjugated Goat Anti-mouse i

mmunoglobulins (Dako) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター (Canto II: BD Biosciences) で検出を行った。データ解析はFlowJo (TreeStar) で行った。その結果を図3に示す。図3のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは陰性コントロールmIgG1で染色した場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは抗ヒトCDH6抗体で染色した場合を示す。細胞表面のhCDH6に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。mIgG1コントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、NIH: OVCAR-3、PA-1、OV-90及び786-O, Caki-1細胞株は、内在的にCDH6を細胞表面上に発現することが示された。

[0361] [実施例3: rG019重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の遺伝子断片の増幅および配列決定]

3) -1 G019抗体産生ハイブリドーマからのtotal RNAの調製

rG019の可変領域を含むcDNAを増幅するためG019抗体産生ハイブリドーマよりTRIzol Reagent (Ambion社) を用いてtotal RNAを調製した。

[0362] 3) -2 5' -RACE PCRによるrG019の重鎖可変領域を含むcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

重鎖可変領域を含むcDNAの増幅は、実施例3) -1で調製したtotal RNAの約1μgとSMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社) を用いて実施した。rG019の重鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属)、及び公知のラット重鎖の定常領域の配列から設計したプライ

マーを用いた。

[0363] 5' - RACE PCRで増幅した重鎖の可変領域を含むcDNAをプラスミドにクローニングし、次に重鎖の可変領域のcDNAのヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。

[0364] 決定されたrG019の重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号16に示し、アミノ酸配列を配列番号15に示した。

[0365] 3) - 3 5' - RACE PCRによるrG019の軽鎖可変領域を含むcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

実施例3) - 2と同様の方法で実施した。ただし、rG019の軽鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属)、及び公知のラット軽鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

[0366] 決定されたrG019の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号11に示し、アミノ酸配列を配列番号10に示した。

[0367] [実施例4: ヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019の作製]

4) - 1 ヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019の発現ベクターの構築

4) - 1 - 1 キメラ及びヒト化軽鎖発現ベクターpCMA-LKの構築
プラスミドpcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen社)を制限酵素XbaI及びPmeIで消化して得られる約5.4kbのフラグメントと、配列番号20に示すヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片をIn-Fusion Advantage PCRクローニングキット (Clontech社)を用いて結合して、pcDNA3.3/LKを作製した。

[0368] pcDNA3.3/LKからネオマイシン発現ユニットを除去することによりpCMA-LKを構築した。

[0369] 4) - 1 - 2 キメラ及びヒト化IgG1タイプ重鎖発現ベクターpCM

A-G1の構築

pCMA-LKをXbaI及びPmeIで消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたDNA断片と、配列番号21で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片をIn-Fusion Advantage PCRクローニングキット (Clontech社) を用いて結合して、pCMA-G1を構築した。

[0370] 4) -1-3 chG019重鎖発現ベクターの構築

配列番号27に示すchG019重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット (Clontech社) を用いて、pCMA-G1を制限酵素BspIで切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することによりchG019重鎖発現ベクターを構築した。なお、chG019重鎖は予期せぬジスルフィド結合を防ぐため、CDR中のシステインをプロリンに置換した配列を用いた。

[0371] 4) -1-4 chG019軽鎖発現ベクターの構築

配列番号22に示すchG019軽鎖をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した (GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット (Clontech社) を用いて、合成したDNA断片とpCMA-LKをXbaI及びPmeIで消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたDNA断片を結合することにより、chG019軽鎖発現ベクターを構築した。

[0372] 4) -2 ヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019の生産及び精製

4) -2-1 chG019の生産

FreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の 1.2×10^9 個のFreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) を3L Fernbach Erlenmeyer Flask (CORNING社) に播

種し、FreeStyle293 expression medium (Invitrogen社)で希釈して 2.0×10^6 細胞/mlに調製した。40mlのOpti-Pro SFM培地 (Invitrogen社)に0.24mgの重鎖発現ベクターと0.36mgの軽鎖発現ベクターと1.8mgのPolyethyleneimine (Polyscience #24765)を加えて穏やかに攪拌し、さらに5分間放置した後にFreeStyle 293F細胞に添加した。37℃、8%CO₂インキュベーターで4時間、90rpmで振とう培養後に600mlのEX-CELL VPRO培地 (SAFC Biosciences社)、18mlのGlutaMAX 1 (GIBCO社)、及び30mlのYeastolate Ultrafiltrate (GIBCO社)を添加し、37℃、8%CO₂インキュベーターで7日間、90rpmで振とう培養して得られた培養上清をDisposable Capsule Filter (Advantec #CCS-045-E1H)でろ過した。

[0373] 4) -2-2 chG019の精製

実施例4) -2-1で得られた培養上清をrProtein Aアフィニティークロマトグラフィーの1段階工程で精製した。培養上清をPBSで平衡化したMabSelect SuReが充填されたカラム (GE Healthcare Bioscience社製)にアプライしたのちに、カラム容量の2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2Mアルギニン塩酸塩溶液 (pH4.0)で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette)によりHBSor (25mM ヒスチジン/5% ソルビトール、pH6.0)へのバッファー置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF10K, Sartorius社)で抗体を濃縮し、IgG濃度を5mg/ml以上に調製した。最後にMinisart Plus filter (Sartorius社)でろ過し、精製サンプル

とした。

[0374] 4) - 3 ヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019の結合性評価

4) - 2で精製したヒトキメラ化抗CDH6抗体chG019のCDH6結合性をフローサイトメトリー法により確認した。実施例1) - 1で作製したpcDNA3.1-hCDH6、又はpcDNA3.1-cynoCDH6、又はpcDNA3.1をそれぞれ293 α 細胞にLipofectamine 2000を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific社)で処理し細胞懸濁液を調製した。これらの細胞懸濁液にchG019を加えて4℃で1時間静置した後、5% FBS含有PBSで2回洗浄し、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したPE標識F(ab')₂ Fragment抗ヒトIgG, Fc γ 抗体(JACKSON IMMUNORESEARCH)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSに再懸濁し、フローサイトメーター(CantoII: BD Biosciences)で検出を行った。データ解析はFlowJo(TreeStar)で行った。図4に示すとおり、chG019は陰性コントロールであるpcDNA3.1導入293T細胞には結合せず、pcDNA3.1-hCDH6及びpcDNA3.1-cynoCDH6導入293T細胞に抗体濃度依存的に結合した。図4において横軸は抗体濃度を示し、縦軸は結合量をMean Fluorescent Intensity (平均蛍光強度)で示す。この結果から、chG019が、ヒトおよびカニクイザルCDH6に対して特異的に結合し、結合活性はほぼ同等であることがわかる。

[0375] [実施例5：ヒト化抗CDH6抗体の作製]

5) - 1 抗CDH6抗体のヒト化体デザイン

5) - 1 - 1 chG019の可変領域の分子モデリング

chG019の可変領域の分子モデリングは、ホモロジーモデリングとして公知の方法 (Methods in Enzymology, 203, 1

21-153, (1991)) を利用した。chG019の重鎖と軽鎖の可変領域に対して高い配列同一性を有するProtein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) に登録されている構造 (PDB ID: 219L) を鋳型に、市販のタンパク質立体構造解析プログラムBioLuminate (Schrodinger社製) を用いて行った。

[0376] 5) -1-2 ヒト化hG019に対するアミノ酸配列の設計

chG019は、CDRグラフティング (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) によりヒト化した。KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)) において既定されるヒトのgamma鎖サブグループ1およびkappa鎖サブグループ1のコンセンサス配列が、chG019のフレームワーク領域に対して高い同一性を有することから、それぞれ、重鎖と軽鎖のアクセプターとして選択された。アクセプター上に移入すべきドナー残基は、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) によって与えられる基準などを参考に三次元モデルを分析することで選択された。

[0377] 5) -2 chG019重鎖のヒト化

設計された3種の重鎖をhH01、hH02及びhH04と命名した。hH01の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号39に記載する。配列番号39のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号40に記載する。hH02の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号43に記載する。配列番号43のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号44に記載する。hH04の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号47に記載する。配列番号47のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号48に

記載する。

[0378] 5) - 3 c h G 0 1 9 軽鎖のヒト化

設計された2種の軽鎖をh L 0 2およびh L 0 3と命名した。h L 0 2の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号31に記載する。配列番号31のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号32に記載する。h L 0 3の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号35に記載する。配列番号35のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号36に記載する。

[0379] 5) - 4 重鎖及び軽鎖の組み合わせによるヒト化h G 0 1 9の設計

h H 0 1及びh L 0 2からなる抗体を「H 0 1 L 0 2抗体」又は「H 0 1 L 0 2」と称する。h H 0 2及びh L 0 2からなる抗体を「H 0 2 L 0 2抗体」又は「H 0 2 L 0 2」と称する。h H 0 2及びh L 0 3からなる抗体を「H 0 2 L 0 3抗体」又は「H 0 2 L 0 3」と称する。h H 0 4及びh L 0 2からなる抗体を「H 0 4 L 0 2抗体」又は「H 0 4 L 0 2」と称する。

[0380] 5) - 5 ヒト化抗C D H 6抗体の発現

5) - 5 - 1 ヒト化h G 0 1 9の重鎖発現ベクターの構築

5) - 5 - 1 - 1 h H 0 1重鎖発現ベクターの構築

配列番号40に示すh H 0 1重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例4) - 1 - 3と同様の方法でh H 0 1重鎖発現ベクターを構築した。

[0381] 5) - 5 - 1 - 2 h H 0 2重鎖発現ベクターの構築

配列番号44に示すh H 0 2重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例4) - 1 - 3と同様の方法でh H 0 2重鎖発現ベクターを構築した。

[0382] 5) - 5 - 1 - 3 h H 0 4重鎖発現ベクターの構築

配列番号48に示すh H 0 4重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例4) - 1 - 3と同様の方法でh H 0 4重鎖発現ベクターを構築した。

[0383] 5) - 5 - 2 ヒト化h G 0 1 9の軽鎖発現ベクターの構築

5) - 5 - 2 - 1 hL02 軽鎖発現ベクターの構築

配列番号32に示すhL02軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至399に示されるhL02軽鎖の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した(GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット(Clontech社)を用いて、pCMA-LKを制限酵素BsiWIで切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することによりhL02軽鎖発現ベクターを構築した。

[0384] 5) - 5 - 2 - 2 hL03 軽鎖発現ベクターの構築

配列番号36に示すhL03軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至399に示されるhL03軽鎖の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例5) - 5 - 2 - 1と同様の方法でhL03軽鎖発現ベクターを構築した。

[0385] 5) - 5 - 3 ヒト化hG019の調製

5) - 5 - 3 - 1 H01L02、H02L02、H02L03、H04L02の生産

実施例4) - 2 - 1と同様の方法で生産した。実施例5) - 4に示した重鎖と軽鎖の組み合わせにより、H01L02、H02L02、H02L03、H04L02を生産した。

[0386] 5) - 5 - 3 - 2 H01L02、H02L02、H02L03、H04L02の2step精製

実施例5) - 5 - 3 - 1で得られた培養上清をrProtein Aアフィニティークロマトグラフィーとセラミックハイドロキシアパタイトの2段階工程で精製した。培養上清をPBSで平衡化したMabSelect SuReが充填されたカラム(GE Healthcare Bioscience社製)にアプライした後に、カラム容量の2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2Mアルギニン塩酸塩溶液(pH4.0)で抗体を溶出した。抗体の含まれる画分を透析(Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette)により

PBSへのバッファー置換を行い、5 mMリン酸ナトリウム／50 mM MES／pH 7.0のバッファーで5倍希釈した後に、5 mM NaPi／50 mM MES／30 mM NaCl／pH 7.0のバッファーで平衡化したセラミックハイドロキシアパタイトカラム（日本バイオラッド、BioScale CHT Type-1 Hydroxyapatite Column）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette）によりHBSor（25 mM ヒスチジン／5% ソルビトール、pH 6.0）へのバッファー置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20（分画分子量UF10K, Sartorius社）にて抗体を濃縮し、IgG濃度を20 mg/mlに調製した。最後にMinisart-Plus filter（Sartorius社）でろ過し、精製サンプルとした。

[0387] [参考例1：抗CDH6抗体NOV0712の作製]

実施例で用いた抗CDH6抗体NOV0712は、国際公開第2016/024195号に記載のNOV0712の軽鎖全長、及び重鎖全長のアミノ酸配列（それぞれ、国際公開第2016/024195の配列番号235及び配列番号234）を参照して作製した。

[0388] 参考例1) - 1 抗CDH6抗体NOV0712

参考例1) - 1 - 1 抗CDH6抗体NOV0712の重鎖発現ベクターの構築

配列番号54に示すNOV0712の重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至428に示されるNOV0712の重鎖の可変領域を含むDNA断片を合成した（GENEART社）。実施例4) - 1 - 3と同様の方法でNOV0712の重鎖発現ベクターを構築した。当該NOV0712の重鎖発現ベクターにより発現するNOV0712の重鎖のアミノ酸配列を、配列番号53に示す。配列番号53に示されるアミノ酸配列中、1～19

番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列である。

[0389] 参考例 1) - 1 - 2 抗CDH6抗体NOV0712の軽鎖発現ベクターの構築

配列番号52に示すNOV0712の軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至405に示されるNOV0712の軽鎖の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例5) - 5 - 2 - 1と同様の方法でNOV0712の軽鎖発現ベクターを構築した。当該NOV0712の軽鎖発現ベクターにより発現するNOV0712の軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号51に示す。配列番号51に示されるアミノ酸配列中、1~20番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列である。

[0390] 参考例 1) - 2 抗CDH6抗体NOV0712の調製

参考例 1) - 2 - 1 抗CDH6抗体NOV0712の生産

実施例4) - 2 - 1と同様の方法でNOV0712を生産した。

[0391] 参考例 1) - 2 - 2 抗CDH6抗体NOV0712の1step精製

参考例 1) - 2 - 1で得られた培養上清から実施例4) - 2 - 2と同様の方法で抗CDH6抗体NOV0712を精製した(抗体濃度HBSorで5mg/l)。

[0392] [実施例6:ヒト化hG019およびNOV0712のin vitro 評価]

6) - 1 ヒト化hG019の結合性評価

抗体と抗原(Recombinant Human CDH6 Fc His chimera, R&D Systems)との解離定数測定は、Biacore T200(GEヘルスケアバイオサイエンス)を使用し、固定化した抗His抗体に抗原をリガンドとして捕捉(キャプチャー)し、抗体をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒスチジン抗体(His capture kit, GEヘルスケアバイオサイエンス)は、センサーチップCM5(GEヘルスケアバイオサイエンス)へ、アミン

カップリング法にて約1000RU共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとして1mM CaCl_2 を添加したHBS-P+ (10mM HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.05% Surfactant P20)を用いた。抗ヒスチジン抗体を固定化したチップ上に、抗原を60秒間添加した後、抗体の希釈系列溶液(0.391-100nM)を流速30 μl /分で300秒間添加し、引き続き600秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、5M MgCl_2 を添加したGlycine溶液pH1.5を流速10 μl /分で30秒間、2回添加した。データの解析は、分析ソフトウェア(BIAevaluation software, version 4.1)のSteady State Affinityモデルを用いて、解離定数(KD)を算出した。結果を表2に示す。

[0393] [表2]

	抗体	KD (M)
1	H01L02	1.5E-09
2	H02L02	1.1E-09
3	H02L03	1.4E-09
4	H04L02	1.1E-09

[0394] 6) -2 ヒト化hG019およびNOV0712のCDH6結合部位の解析

6) -2-1 ドメイン欠失体を用いたエピトープ解析

実施例2) -2-1で作成した各ドメイン欠失体発現ベクター、及び全長hCDH6を発現するpcDNA3.1-hCDH6をLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO_2 の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した293 α 細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、実施例5) -5-3で調製したヒト化hG019抗体4種

(クローン番号は、H01L02、H02L02、H02L03およびH04L02)、又は、参考例1で調製した抗CDH6抗体NOV0712、又は、陰性コントロールとしてヒトIgG1 (Calbiochem) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したAPC-anti-human IgG goat F(ab')₂ (Jackson laboratory) を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター (Canto II: BD Biosciences) で検出を行った。データ解析はFlowJo (TreeStar) で行った。その結果を図5-1～図5-6に示す。図5-1～図5-6のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すAPCの蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは遺伝子を導入していない陰性コントロール293α細胞を用いた場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは、全長hCDH6又は各ECドメイン欠失293α細胞を用いた場合を示す。細胞表面の全長hCDH6又は各ECドメイン欠失体に抗体が結合した場合は、蛍光強度が増強する。ヒトIgG1コントロールはいずれの導入細胞にも結合しない。ヒト化hG019抗体4種(クローン番号は、H01L02、H02L02、H02L03およびH04L02)は、全長hCDH6、EC1欠失体、EC2欠失体、EC4欠失体、及びEC5欠失体には結合するが、EC3欠失体には結合しない。すなわち、ヒト化hG019抗体4種はhCDH6のEC3をエピトープとして特異的に結合することが示された。一方、抗CDH6抗体NOV0712は、全長hCDH6、EC1欠失体、EC2欠失体、EC3欠失体、及びEC4欠失体には結合するが、EC5欠失体には結合しない。すなわち、抗CDH6抗体NOV0712抗体はhCDH6のEC5をエピトープとして特異的に結合することが示され、国際公開第2016/024195号に記載されているNOV0712のエピトープ情報と一致する。この結果から、NOV0712と本明細書で取得したヒト化hG019抗体4種は、異なる性質を示す抗CD

H6抗体であることが示された。

[0395] 6) - 2 - 2 抗体の結合競合アッセイ

6) - 2 - 2 - 1 786-O/hCDH6安定発現細胞株の作製

786-O/hCDH6安定発現細胞株は、786-O細胞(ATCC)にヒトCDH6全長発現用組換えレトロウイルスを感染させることにより作製した。ヒトCDH6発現レトロウイルスベクター(pQCXIN-hCDH6)は、ヒトCDH6タンパク質(NP_004923)をコードするcDNA発現ベクター(Origene社RC217889)を用いて、当業者に公知な方法に従いレトロウイルスベクターpQCXIN(CLONTECH)に組み込むことにより作製された。FuGene HD(Promega)を用いてレトロウイルスパッケージング細胞RetroPack P T67(CLONTECH)にpQCXIN-hCDH6を一過性に導入し、48時間後に組換えレトロウイルスを含む培養上清を回収し、786-O細胞培養系に添加することで同細胞に感染させた。感染3日後から、G418(Gibco)を終濃度50mg/mLで添加した培地で37℃、5%CO₂の条件下で培養を行い感染細胞の薬剤選抜を行うことで、ヒトCDH6を安定的に発現する細胞株786-O/hCDH6を樹立した。実施例2)-3-1と同様にフローサイトメトリーにて安定発現株でのヒトCDH6の高発現を確認した(図6)。検出用抗体には5% FBS含有PBSで500倍に希釈したGoat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody Alexa Fluor 647(Thermo Fisher Scientific)を使用した。その結果を図6に示す。図8のヒストグラムにおいて、横軸は抗体結合量を表すAlexa Fluor 647の蛍光強度、縦軸は細胞数を示す。網掛けで示すヒストグラムは陰性コントロールmIgG1で染色した場合を示し、白抜き実線で示すヒストグラムは抗ヒトCDH6抗体で染色した場合を示す。細胞表面のhCDH6に抗体が結合したことによって蛍光強度が増強したことを示す。mIgG1コントロールはいずれの細胞にも結合しない。この結果、786

－O／hCDH6安定発現細胞株では親株786－O細胞と比較して、ヒトCDH6を高発現することが示された。

[0396] 6)－2－2－2 ラベル化H01L02及びラベル化NOV0712を用いた結合競合アッセイ

Alexa Fluor 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher) を用いて、ラベル化H01L02及びラベル化NOV0712を作製した。6)－2－2－1で作製した786－O／hCDH6安定発現細胞株の細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、ラベル化NOV0712又はラベル化H01L02を終濃度5 nMで添加し、さらに実施例5)－5－3で調製したヒト化hG019抗体4種（クローン番号は、H01L02、H02L02、H02L03およびH04L02）、又は、参考例1で調製した抗CDH6抗体NOV0712、又は、陰性コントロールとしてヒトIgG1 (Calbiochem) を図7の横軸で示す終濃度で添加して懸濁し、4℃で1時間静置した。5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター (Cantoll: BD Biosciences) で検出を行った。データ解析はFlowJo (TreeStar) で行った。その結果を図7に示す。横軸はラベル化していない抗体の添加時の終濃度を示し、縦軸は結合量をMean Fluorescent Intensity (平均蛍光強度) で示す。ラベル化NOV0712を添加した細胞にラベル化していないNOV0712を添加した場合は、同じエピトープを持ち結合が競合するため、添加濃度依存的にラベル化していない抗体に置き換わりラベル化抗体の結合量が減少する。一方、ラベル化NOV0712を添加した細胞にヒト化hG019抗体4種、又は陰性コントロールとしてヒトIgG1を添加しても、ラベル化抗体の結合量に変化は無いことから、これらの抗体はエピトープが異なり結合が競合しないことが示される。同様に、ラベル化H01L02を添加した細胞にラベル化していないヒト化hG019抗体4種を添加した場合は、同じエピトープを持ち結合が競合するため、添加濃度依存的にラベル

化していない抗体に置き換わりラベル化抗体の結合量が減少する。一方、ラベル化H01L02を添加した細胞にNOV0712、又は陰性コントロールとしてヒトIgG1を添加しても、ラベル化抗体の結合量に変化は無いことから、これらの抗体はエピトープが異なり結合が競合しないことが示される。

[0397] 6) - 3 ヒト化hG019およびNOV0712の内在化活性評価

ヒト化hG019およびNOV0712の内在化活性は、タンパク質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗ヒトIgG試薬Hum-ZAP（ADVANCED TARGETING SYSTEMS）を用いて評価した。すなわち、ヒトCDH6陽性卵巣腫瘍細胞株NIH:OVCAR-3（ATCC）を 4×10^3 cells/wellで96wellプレートに播種して37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。ヒトCDH6陽性腎細胞腫瘍細胞株786-O（ATCC）は 1×10^3 cells/wellで96wellプレートに播種して一晩培養した。ヒトCDH6陽性卵巣腫瘍細胞株PA-1（ATCC）を 1×10^3 cells/wellで96wellプレートに播種して37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。翌日、抗CDH6抗体（終濃度：1 nM）、又は、陰性コントロール抗体としてヒトIgG1抗体（Calbiochem）を添加した。さらにHum-ZAP（終濃度：0.5 nM）または、陰性コントロールとして毒素を結合していないF(ab')₂ Fragment Goat Anti-human IgG, Fc(gamma) Fragment Specific（JACKSON IMMUNORESEARCH）（終濃度：0.5 nM）を添加し、3日間37℃、5% CO₂条件下で培養した。生存細胞数は、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability AssayによるATP活性（RLU）の定量で測定した。この評価では、ヒト化抗CDH6抗体の内在化活性に依存してHum-ZAPが細胞内に取り込まれ、タンパク合成を阻害するサポリンが細胞内に放出されることで、細胞増殖が抑制される。抗CDH6抗体添加による細胞増

殖抑制作用は、Hum-ZAPの代わりに陰性コントロールを添加したウェルの生存細胞数を100%とした相対生存率で表記した。図8に細胞生存率の表を示す。本実験において内在化活性が強い抗体は低い細胞生存率を示すと考えられる。この結果、ヒト化hG019抗体4種は3種の細胞株いずれにおいても細胞生存率から予測される内在化率は約50～75%であり、非常に高い内在化活性を示し、NOV0712と比較して、さらに高い内在活性を示す。ADCの薬効メカニズムから、高い内在化活性を有する抗体は、ADC化抗体をして、より適していると考えられる。

[0398] [実施例7：ヒト化hG019の改変体の作製]

7) - 1 ヒト化hG019の改変体の設計

7) - 1 - 1 H01L02の変換領域改変体の設計

実施例5) - 2に記載のhH01アミノ酸配列において71番目のチロシンをアラニンへ置換した重鎖をhH11と命名し、81番目のグルタミンをセリンに置換し、123番目のフェニルアラニンをアラニンに置換した重鎖をhH31と命名した。hH11の重鎖可変領域アミノ酸配列を、配列番号55に記載する。配列番号55のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号56に記載する。hH31の重鎖可変領域アミノ酸配列を、配列番号60に記載する。配列番号60のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号61に記載する。

[0399] 7) - 1 - 2 ヒト重鎖LALA体の設計

実施例5) - 2に記載のhH01のアミノ酸配列において、EU indexにより特定される234位、235位のロイシンをアラニンへ置換した重鎖を設計した（本明細書中、「hH01A」と称する）。また、実施例7) - 1 - 1で設計したhH11の変換領域を有し、IgG1のアイソタイプであり、かつ、EU indexにより特定される234位、235位のロイシンをアラニンへ置換した重鎖を設計した（本明細書中、「hH11A」と称する）。実施例7) - 1 - 1で設計したhH31の変換領域を有し、IgG1のアイソタイプであり、かつ、EU indexにより特定される

234位、235位のロイシンをアラニンへ置換した重鎖を設計した（本明細書中、「hH31A」と称する）。

[0400] 7) - 2 重鎖及び軽鎖の組み合わせによるヒト化hG019の結合親和性改変体の設計

hH01A及びhL02からなる抗体を「H01L02A抗体」又は「H01L02A」と称する。hH11A及びhL02からなる抗体を「H11L02A抗体」又は「H11L02A」と称する。hH31A及びhL02からなる抗体を「H31L02A抗体」又は「H31L02A」と称する。

[0401] 7) - 3 ヒト化hG019の結合親和性改変体の発現

7) - 3 - 1 ヒト化IgG1LALAタイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1LALAの構築

配列番号71で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1LALA定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片をもちいて、実施例4) - 1 - 2と同様の方法でpCMA-G1LALAを構築した。

[0402] 7) - 3 - 2 hH01A重鎖発現ベクターの構築

配列番号66に示すhH01Aのヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した（GENEART社）。In-Fusion HD PCRクローニングキット（Clontech社）を用いて、pCMA-G1LALAを制限酵素BspIで切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することによりhH01A発現ベクターを構築した。

[0403] 7) - 3 - 3 hH11A重鎖発現ベクターの構築

配列番号68に示すhH11Aのヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した（GENEART社）。実施例7) - 3 - 2と同様の方法でhH11A発現ベクターを構築した。

[0404] 7) - 3 - 4 hH31A重鎖発現ベクターの構築

配列番号70に示すhH31Aのヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した（GENEART社）。実施例7) - 3 - 2と同様の方法でhH31A発現ベクターを構築した。

[0405] 7) - 4 ヒト化hG019の結合親和性改変体の調製

7) - 4 - 1 H01L02A、H11L02A、H31L02Aの生産
実施例4) - 2 - 1と同様の方法で生産した。実施例5) - 5 - 2 - 1で構築した軽鎖発現ベクターと実施例7) - 3で構築した重鎖発現ベクターを用いて、実施例7) - 2に示したH鎖とL鎖の組み合わせに対応したH鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターの組み合わせで、H01L02A、H11L02A、H31L02Aを取得した。

[0406] 7) - 4 - 2 H01L02A、H11L02A、H31L02Aの2 step精製

実施例7) - 4 - 1で得られた培養上清を用いて、実施例5) - 5 - 3 - 2と同様の方法で精製した。

[0407] [実施例8：ヒト化hG019の結合親和性改変体のin vitro評価]

8) - 1 H01L02A、H11L02A、H31L02Aの結合性評価

実施例7) - 4で作製したH01L02A、H11L02A、H31L02AとヒトCDH6との解離定数測定は、Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience社製)を使用し、His Capture Kit (GE Healthcare Bioscience社製)を用いて固定化したAnti-histidine antibodyに抗原をリガンドとして捕捉(キャプチャー)し、抗体をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。センサーチップとしてCM5 (GE Healthcare Bioscience社製)、ランニングバッファーとして20mM Tris-HCl、150mM NaCl、1mM CaCl₂、0.05% Surfactant P20、pH7.4を用いた。チップ上に1μg/mLのRecombinant Human Cadherin-6 (KCAD)/Fc Chimera (RD-SYSTEMS)を10μL/分で60秒間添加した後、実施例7) - 4で調製し

た抗体の希釈系列溶液 ($0.11 \sim 81 \mu\text{g/mL}$) を流速 $30 \mu\text{L/分}$ で 180 秒間添加し、引き続き 180 秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、Glycine 1.5 (GE Healthcare Bioscience 社製) を流速 $20 \mu\text{L/分}$ で 30 秒間添加した。データの解析には Steady State Affinity モデルを用いて、解離定数 (KD) を算出した。結果を表 3 に示す。

[0408] [表3]

名称	KD (nM)
H01L02A	2.8
H11L02A	43.1
H31L02A	11.1

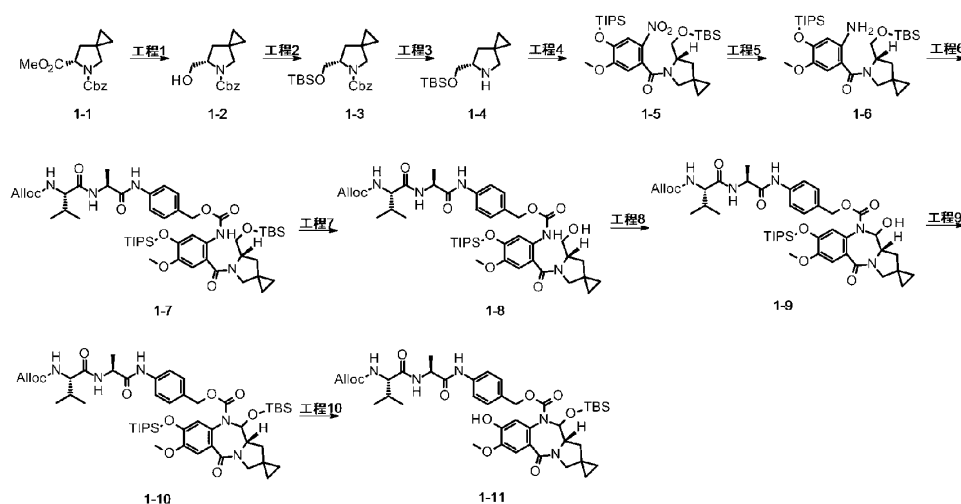
[0409] [実施例 9 : コントロール用抗 LPS 抗体の作製]

抗 LPS 抗体は WO 2015/046505 を参照して作製した。本実施例で使用した抗 LPS 抗体は、アイソタイプが IgG1 である (本明細書中、抗 LPS 抗体ともいう)。本実施例で使用した抗 LPS 抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を配列番号 72 及び配列番号 73 に示す。

[0410] [実施例 10 製造中間体の合成]

[実施例 10-1 : 中間体 1]

[0411] [化53]



[0412] 工程1：ベンジル（6S）－6－（ヒドロキシメチル）－5－アザスピロ
[2.4]ヘプタン－5－カルボキシレート（1－2）

5－ベンジル 6－メチル（6S）－5－アザスピロ[2.4]ヘプタン
－5，6－ジカルボキシレート（1－1）（104mmol，WO2012
087596）のテトラヒドロフラン（500mL）溶液に、水素化ホウ素
リチウム（4.30g，178mmol）を0℃にて少量ずつ加えた。0℃
にて30分撹拌した後、室温にて2時間撹拌した。0℃にて水（180mL
）、2規定塩酸（186mL）を加え、減圧留去した。得られた残渣を酢酸
エチルで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウ
ムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣（1－2）（27.9g，90%
）をそのまま次の反応に用いた。

[0413] 工程2：ベンジル（6S）－6－（{tert-ブチル（ジメチル）
シリル}オキシ}メチル）－5－アザスピロ[2.4]ヘプタン－5－カル
ボキシレート（1－3）

上記工程1にて得られた化合物（1－2）（27.9g，107mmol）
とイミダゾール（14.5g，214mmol）のジクロロメタン（300mL）
溶液に、室温にてtert-ブチルジメチルシリルクロリド（24.
2g，160mmol）を加え、室温にて18時間撹拌した。反応溶液を
飽和クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し
、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカ
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）～50：50（v／v）]にて精製し、目的物（1－3）（32.5g
，81%）を得た。

¹H-NMR（CDCl₃）δ：7.39－7.34（5H，m），5.2
3－5.11（2H，m），4.10－3.48（4H，m），3.16－
3.14（1H，m），2.15－2.04（1H，m），1.81－1.
77（1H，m），0.91－0.88（9H，m），0.65－0.55
（4H，m），0.08－0.01（6H，m）。

MS (APCI) m/z : 376 (M+H) +

[0414] 工程3: (6S)-6-({[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}メチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプタン(1-4)

上記工程2で得られた化合物(1-3)(32.5g, 86.5mmol)のエタノール(400mL)溶液に、室温にて7.5%パラジウム炭素触媒(54%水分、5.00g)を加え、室温、水素雰囲気下にて6時間撹拌した。反応溶液をセライト濾過し、濾液を減圧留去し、目的物(1-4)(21.3g, 定量的)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 3.79-3.77 (1H, m), 3.71-3.69 (1H, m), 3.65-3.60 (1H, m), 3.01-2.98 (2H, m), 1.81-1.71 (2H, m), 0.90 (9H, s), 0.65-0.57 (4H, m), 0.08 (3H, s), 0.07 (3H, s).

MS (APCI、ESI) m/z : 242 (M+H) +

[0415] 工程4: [(6S)-6-({[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}メチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル](5-メトキシ-2-ニトロ-4-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル)メタノン(1-5)

5-メトキシ-2-ニトロ-4-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}安息香酸(52.2g, 141mmol, US20150283262)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物(23.8g, 155mmol)のジクロロメタン(500mL)溶液に、氷冷下にてN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(35.0g, 170mmol)を加えた。反応混合物を室温にて撹拌した。カルボン酸消失後、-60℃にて上記工程3にて得られた化合物(1-4)(34.1g, 141mmol)とトリエチルアミン(29.4mL, 212mmol)のジクロロメタン(100mL)溶液をゆっくりと滴下した。反応溶液を室温にて一晩撹拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、反応混合物をクロロホル

ムで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧留去して得られた残渣に酢酸エチルとジエチルエーテルを加え、固体成分を濾過により取り除き、濾液を減圧留去し、得られた残渣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)～25：75 (v/v)] にて精製し、目的物 (1-5) (55.0 g, 66%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.72–7.66 (1H, m), 6.80–6.73 (1H, m), 4.53–4.49 (1H, m), 4.04–3.95 (1H, m), 3.91–3.88 (3H, m), 3.59–3.54 (1H, m), 3.36–3.25 (0.5H, m), 3.01–2.96 (1.5H, m), 2.24–2.20 (0.3H, m), 2.09–2.05 (0.7H, m), 2.00–1.97 (0.7H, m), 1.69–1.67 (0.3H, m), 1.32–1.24 (3H, m), 1.12–1.05 (18H, m), 0.93–0.91 (6H, m), 0.79–0.77 (3H, m), 0.71–0.62 (2H, m), 0.57–0.40 (2H, m), 0.12–0.10 (4H, m), 0.11–0.15 (2H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 593 ($\text{M}+\text{H}$) +

[0416] 工程5: (2-アミノ-5-メトキシ-4-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル) [(6S)-6-({[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}メチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]メタノン (1-6)

上記工程4で得られた化合物 (1-5) (55.0 g, 92.8 mmol) のエタノール (300 mL) 溶液に、窒素雰囲気下にて、7.5%パラジウム炭素 (10.0 g) を加えた。窒素風船を直ちに水素風船に付け替え、反応混合物を水素雰囲気下、室温で激しく攪拌した。原料消失後、反応混合物を濾過し、濾液を減圧留去し、得られた目的物 (1-6) (52.2 g, 100%) をそのまま次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.71 (1H, s), 6.25 (1H, s), 4.55–4.28 (2H, m), 3.97 (1H, m), 3.75–3.62 (3H, m), 3.70 (3H, s), 3.09–3.07 (1H, m), 2.24–2.19 (1H, m), 1.81–1.68 (1H, m), 1.27–1.22 (3H, m), 1.09–1.05 (18H, m), 0.90 (9H, s), 0.65–0.46 (4H, m), 0.07–0.03 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 563 ($M+H$) +

[0417] 工程6: N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バリル-N-[4-({ [(2-{ [(6S)-6-({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -5-アザスピロ [2.4] ヘプト-5-イル] カルボニル} -4-メトキシ-5-{ [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバモイル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド (1-7)

上記工程5で得られた化合物 (1-6) (18.6g, 33.0mmol) およびトリエチルアミン (6.26mL, 45.2mmol) のTHF (300mL) 溶液に、エタノール-氷浴上にて、トリホスゲン (4.22g, 14.2mmol) をゆっくりと添加した。添加後、氷冷した反応混合物に、N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バリル-N-[4-(ヒドロキシメチル) フェニル] -L-アラニンアミド (11.4g, 30.2mmol, WO2011130598) とトリエチルアミン (6.26mL, 45.2mmol) のテトラヒドロフラン (100mL)、N,N-ジメチルホルムアミド (30mL) 混合溶液をゆっくりと滴下した。滴下後、氷浴をはずし、反応混合物を、窒素雰囲気下、40℃にて攪拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ- [ヘキサン: 酢酸エチル=100:0 (v/v) ~40:60 (v/v)]

] にて精製し、目的物 (1-7) (23.5 g, 74%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.99 (1H, m), 8.58 (1H, s), 7.80 (1H, s), 7.55–7.53 (2H, m), 7.34–7.32 (2H, m), 6.77–6.75 (2H, m), 5.94–5.87 (1H, m), 5.40–5.38 (1H, m), 5.33–5.29 (1H, m), 5.23–5.21 (1H, m), 5.13 (1H, m), 5.10 (2H, m), 4.69–4.64 (1H, m), 4.62–4.52 (2H, m), 4.06–4.03 (1H, m), 3.98 (1H, m), 3.76–3.65 (6H, m), 3.04 (1H, m), 2.28–2.26 (1H, m), 2.18–2.13 (1H, m), 1.46 (3H, m), 1.32–1.25 (3H, m), 1.11–1.09 (18H, m), 0.99–0.84 (15H, m), 0.65–0.40 (4H, m), 0.08–0.00 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 966 ($M+H$) +

[0418] 工程7: N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-[4-({[(2- {[(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシ-5- {[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]-L-アラニンアミド (1-8)

上記工程6で得られた化合物 (1-7) (23.5 g, 24.3 mmol) のテトラヒドロフラン (50 mL), メタノール (50 mL), 水 (44 mL) 溶液に、室温下にて酢酸 (200 mL) を加えた。反応混合物を室温にて攪拌した。原料消失後、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣を、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 (v/v)] にて精製し、目的物 (1-8) (18.0 g, 87%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.64–8.62 (1H, m), 8.5

0 (1 H, m), 7.69 (1 H, m), 7.55–7.53 (2 H, m),
 , 7.34–7.32 (2 H, m), 6.79–6.75 (3 H, m), 5.
 .91–5.89 (1 H, m), 5.39 (1 H, m), 5.32–5.2
 9 (1 H, m), 5.23–5.21 (1 H, m), 4.68–4.54 (
 4 H, m), 4.31 (1 H, m), 4.06–4.04 (1 H, m), 3.
 .81–3.79 (3 H, m), 3.76 (3 H, s), 3.63–3.6
 1 (1 H, m), 3.13–3.11 (1 H, m), 2.16–2.13 (
 1 H, m), 1.87–1.81 (2 H, m), 1.46–1.43 (3 H
 , m), 1.30–1.24 (3 H, m), 1.12–1.08 (18 H,
 m), 0.98–0.91 (6 H, m), 0.63–0.45 (4 H, m)

MS (APCI、ESI) m/z : 852 (M+H) +

[0419] 工程8 : N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-
 -バリル-N-{4-[({ [(11a' S)-11'-ヒドロキシ-7'-
 -メトキシ-5'-オキソ-8'-{ [トリ(プロパン-2-イル)シリル
]オキシ}-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ[シクロプロパ
 ン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10
 ' (5' H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラ
 ニンアミド (1-9)

ジメチルスルホキシド (3.75 mL, 52.8 mmol) のジクロロメ
 タン (300 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、-78℃にて、塩化オキサリル
 (2.17 mL, 25.3 mmol) をゆっくりと滴下した。滴下後、反応
 混合物を-78℃にて攪拌した。反応混合物に、上記工程7で得られた化合
 物 (1-8) (18.0 g, 21.1 mmol) のジクロロメタン (50.
 0 mL) 溶液をゆっくりと滴下した。反応溶液に-78℃にて、トリエチル
 アミン (14.6 mL, 105 mmol) を加えた。添加後、冷媒浴をはず
 し、室温までゆっくりと昇温した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反
 応混合物をクロロホルム (200 mL) で抽出した。有機層を水および飽和

食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣を、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)～0：60 (v/v)] にて精製し、目的物 (1-9) (16.5 g, 92%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.51–8.36 (1H, m), 7.54–7.38 (2H, m), 7.22–7.07 (3H, m), 6.73–6.64 (1H, m), 5.94–5.87 (2H, m), 5.33–5.22 (3H, m), 5.09 (1H, m), 4.97 (1H, m), 4.64–4.58 (4H, m), 4.02–4.00 (1H, m), 3.86–3.83 (3H, m), 3.75–3.70 (1H, m), 3.61–3.54 (2H, m), 3.38–3.29 (1H, m), 2.40 (1H, m), 2.16–2.14 (1H, m), 1.74–1.71 (1H, m), 1.44 (3H, m), 1.18–1.16 (3H, m), 1.05–1.00 (18H, m), 0.97–0.92 (6H, m), 0.72–0.60 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 850 ($M+H$) +

[0420] 工程9：N-[(プロペ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[(11a'-S)-11'-{tert-ブチル(ジメチル)シリル}オキシ]-7'-メトキシ-5'-オキソ-8'-{トリ(プロパン-2-イル)シリル}オキシ]-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド(1-10)

上記工程8で得られた化合物(1-9)(12.0 g, 14.1 mmol)および2, 6-ルチジン(6.58 mL, 56.5 mmol)のジクロロメタン(200 mL)溶液に、窒素雰囲気下、0℃にて、トリフルオロメチルスルホン酸tert-ブチルジメチルシリル(9.73 mL, 42.3 mmol)をゆっくりと滴下した。氷冷下、10分間攪拌した後に、氷浴をは

ずし、室温にて攪拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物をクロロホルムで抽出した水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣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) ～25：75 (v/v)] にて精製し、目的物 (1-10) (8.12 g, 60%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.67–8.45 (1H, m), 7.50–7.44 (2H, m), 7.19 (1H, s), 7.13 (2H, m), 6.95 (2H, m), 6.62–6.57 (2H, m), 6.01 (1H, m), 5.95–5.86 (1H, m), 5.33–5.13 (3H, m), 4.82 (1H, m), 4.65–4.54 (3H, m), 4.03–4.01 (1H, m), 3.84–3.82 (3H, m), 3.73–3.66 (1H, m), 3.50–3.48 (1H, m), 3.27 (1H, m), 2.37–2.33 (1H, m), 2.19–2.13 (1H, m), 1.54–1.43 (3H, m), 1.22–1.13 (3H, m), 1.10–1.00 (18H, m), 0.97–0.91 (6H, m), 0.81 (9H, s), 0.76–0.59 (4H, m), 0.19–0.09 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 964 ($\text{M}+\text{H}$) +

[0421] 工程10: N-[(プロペ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -
 L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' - { [tert-
 ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -8' -ヒドロキシ-7' -メトキシ
 -5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロ
 パン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -
 10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-
 アラニンアミド (1-11)

上記工程9で得られた化合物 (1-10) (8.12 g, 8.42 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (90 mL)、水 (2 mL) 溶液に、

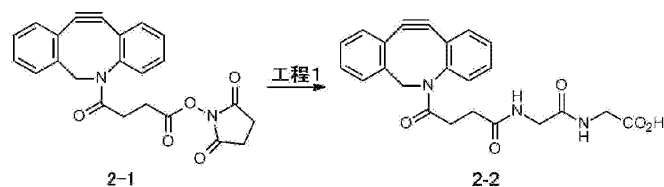
酢酸リチウム (0.611 g, 9.26 mmol) を加え、室温下で攪拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=100：0 (v/v) ~ 0：100 (v/v)] にて精製し、目的物 (1-11) (5.48 g, 81%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.76–8.60 (1H, m), 8.02–7.56 (1H, m), 7.45–7.44 (2H, m), 7.21 (1H, s), 7.10–7.09 (2H, m), 6.81–6.74 (1H, m), 6.65 (1H, s), 6.23 (1H, s), 6.01–5.99 (1H, m), 5.95–5.84 (1H, m), 5.41–5.20 (2H, m), 5.16 (1H, m), 4.84 (1H, m), 4.67–4.54 (4H, m), 4.05–4.03 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.71 (1H, m), 3.55–3.51 (1H, m), 3.26 (1H, m), 2.35 (1H, m), 2.18–2.12 (1H, m), 1.55–1.42 (3H, m), 0.97–0.92 (6H, m), 0.81 (9H, s), 0.76–0.61 (4H, m), 0.20–0.06 (6H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 808 ($\text{M}+\text{H}$) +

[実施例 10-2：中間体 2]

[0422] [化54]



[0423] 工程 1：N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシン (2-2)

グリシルグリシン (0.328 g, 2.49 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.433 mL, 2.49 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) 溶液に、1- {[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] オキシ} ピロリジン-2, 5-ジオン (2-1) (1.00 g, 2.49 mmol, Click Chemistry Tools)、水 (10 mL) を室温にて加え、同温度にて一晩撹拌した。減圧留去し、得られた残渣を、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、目的物 (0.930 g, 89%) を得た。

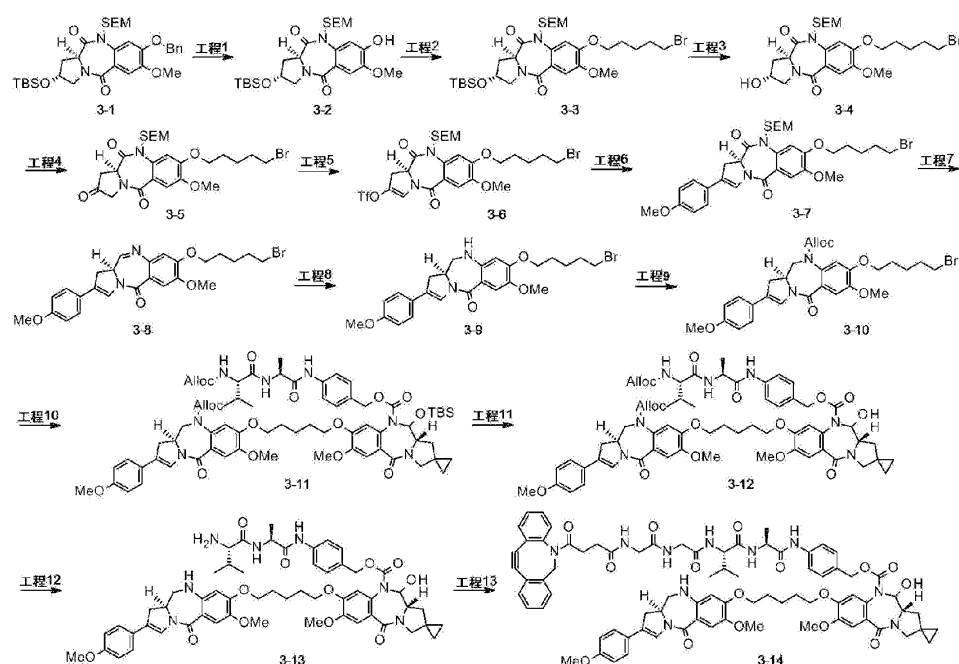
¹H-NMR (DMSO-D₆) δ : 12.58 (1H, s), 8.14-8.12 (1H, m), 8.08-8.07 (1H, m), 7.69-7.68 (1H, m), 7.62-7.61 (1H, m), 7.53-7.45 (3H, m), 7.40-7.29 (3H, m), 5.05-5.01 (1H, m), 3.73-3.72 (2H, m), 3.66-3.60 (3H, m), 2.66-2.60 (1H, m), 2.33-2.24 (1H, m), 2.08-2.04 (1H, m), 1.81-1.77 (1H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 420 [(M+H)⁺].

[実施例10-3：薬物リンカー1]

[0424]

[化55]



[0425] 工程1：(2R, 11aS) - 2 - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} - 8 - ヒドロキシ - 7 - メトキシ - 10 - { [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 5, 11 (10H, 11aH) - ジオン (3-2)

(2R, 11aS) - 8 - (ベンジルオキシ) - 2 - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} - 7 - メトキシ - 10 - { [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 5, 11 (10H, 11aH) - ジオン (3-1) (25.5g, 41.6mmol, WO2016149546) のテトラヒドロフラン (150mL)、エタノール (150mL) 溶液に、窒素雰囲気下、5%パラジウム炭素 (54%水分、10.0g) を加えた後、反応溶液を水素雰囲気下、室温にて三日間攪拌した。反応溶液にクロロホルムを加え、セライト濾過した後、濾液を減圧留去した。得られた残渣

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)～50：50 (v/v)] にて精製し、目的物 (3-2) (19.4 g, 89%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.36 (1H, s), 7.25 (1H, s), 6.01 (1H, s), 5.45–5.43 (1H, m), 4.69–4.67 (1H, m), 4.60–4.55 (1H, m), 4.23–4.21 (1H, m), 3.96 (3H, s), 3.76–3.68 (2H, m), 3.63–3.61 (1H, m), 3.56–3.53 (1H, m), 2.88–2.83 (1H, m), 2.03–2.00 (1H, m), 1.00–0.98 (2H, m), 0.87 (9H, s), 0.10 (6H, s), 0.02 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 523 (M+H) +

[0426] 工程2: (2R, 11aS)–8–[(5-ブロモペンチル) オキシ]–2–{[tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ}–7-メトキシ–10–{[2–(トリメチルシリル) エトキシ] メチル}–2, 3-ジヒドロ–1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4] ベンゾジアゼピン–5, 11 (10H, 11aH)–ジオン (3-3)

上記工程1にて得られた化合物 (3-2) (10.8 g, 20.7 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (30 mL) 溶液に、1, 5-ジブロモペンタン (23.8 g, 103 mmol)、炭酸カリウム (3.43 g, 24.8 mmol) を室温で加えた。室温で3時間攪拌した後、反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣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＝90：10 (v/v)～50：50 (v/v)] にて精製し、目的物 (3-3) (14.5 g, 定量的) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.34 (1H, s), 7.21 (1H, s), 5.52–5.49 (1H, m), 4.63–4.62 (1H, m)

, 4.58–4.55 (1H, m), 4.24–4.22 (1H, m), 4.07–4.04 (2H, m), 3.92 (3H, s), 3.82–3.64 (3H, m), 3.56–3.53 (1H, m), 3.45–3.43 (2H, m), 2.86–2.84 (1H, m), 2.04–2.00 (1H, m), 1.97–1.87 (4H, m), 1.66–1.62 (2H, m), 1.01–0.98 (2H, m), 0.87 (9H, s), 0.10 (6H, s), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 673 [81Br, (M+H)⁺], 671 [79Br, (M+H)⁺].

[0427] 工程3: (2R, 11aS)–8–[(5–ブロモペンチル)オキシ]–2–ヒドロキシ–7–メトキシ–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–2,3–ジヒドロ–1H–ピロロ[2,1–c][1,4]ベンゾジアゼピン–5,11(10H, 11aH)–ジオン(3–4)

上記工程2にて得られた化合物(3–3)(21.5mmol)のテトラヒドロフラン(40mL)溶液に、1mol/Lのテトラブチルアンモニウムフロリド テトラヒドロフラン溶液(28.0mL, 28.0mmol)を0℃にて加えた。室温にて30分間攪拌した後、反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[クロロホルム:メタノール=97.5:2.5(v/v)~92.5:7.5(v/v)]にて精製し、目的物(3–4)(11.3g, 94%)を得た。

[0428] ¹H–NMR (CDCl₃) δ: 7.34 (1H, s), 7.21 (1H, s), 5.53–5.50 (1H, m), 4.69–4.64 (2H, m), 4.32–4.30 (1H, m), 4.10–4.00 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.88–3.75 (2H, m), 3.73–3.64 (2H, m), 3.45–3.44 (2H, m), 2.99–2.96 (1H, m), 2.15–2.09 (1H, m), 1.99–1.85 (5

H, m), 1.68–1.62 (2H, m), 1.01–0.95 (2H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 559 [81Br, (M+H)⁺], 557 [79Br, (M+H)⁺].

[0429] 工程4: (11aS)–8–[(5–ブロモペンチル)オキシ]–7–メトキシ–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–1H–ピロロ[2,1–c][1,4]ベンゾジアゼピン–2,5,11(3H,10H,11aH)–トリオン(3–5)

上記工程3にて得られた化合物(3–4)(11.3g, 20.2mmol)、テトラブチルアンモニウムブロミド(0.325g, 1.01mmol)、臭化カリウム(0.240g, 2.02mmol)を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(60mL)、ジクロロメタン(60mL)に溶解させ、nor-AZADO(0.0279g, 0.202mmol)、次亜塩素酸ナトリウム五水和物(2.03g, 27.2mmol)を0℃にて加え、0℃にて30分間攪拌した。原料が残存したため、次亜塩素酸ナトリウム五水和物(1.00g, 13.4mmol)を0℃にて加え、0℃にて15分攪拌した。さらに次亜塩素酸ナトリウム五水和物(0.300g, 4.03mmol)を0℃にて加え、0℃にて15分攪拌し、原料の消失をTLCにて確認した。反応溶液にチオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、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た。減圧留去し、得られた残渣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=75:25(v/v)~40:60(v/v)]にて精製し、目的物(3–5)(9.74g, 87%)を得た。

¹H-NMR(CDCI₃) δ : 7.33(1H, s), 7.24(1H, s), 5.56–5.53(1H, m), 4.71–4.69(1H, m), 4.66–4.63(1H, m), 4.27–4.22(1H, m), 4.12–4.02(2H, m), 3.93–3.88(4H, m), 3.82–3.75(1H, m), 3.69–3.67(1H, m), 3.61–

3.56 (1H, m), 3.46–3.44 (2H, m), 2.82–2.77 (1H, m), 1.97–1.89 (4H, m), 1.68–1.64 (2H, m), 1.05–0.93 (2H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 557 [81Br, (M+H)⁺], 555 [79Br, (M+H)⁺].

[0430] 工程5: (11aS)–8–[(5-ブロモペンチル)オキシ]–7-メトキシ–5,11-ジオキソ–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–5,10,11,11a-テトラヒドロ–1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン–2-イル トリフルオロメタンスルフォネート (3–6)

上記工程4にて得られた化合物(3–5) (9.74g, 17.5mmol) のジクロロメタン(160mL)溶液に、2,6-ルチジン(8.17mL, 70.1mmol)を–40℃にて加え、–40℃にて10分間撹拌した。反応溶液に無水トリフルオロメタンスルホン酸(8.85mL, 52.6mmol)を–40℃にて加え、–40℃にて30分間撹拌した。反応溶液に10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣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=95:5→70:35]にて精製した後、NH₂シリカゲルクロマトグラフィー[ヘキサン:酢酸エチル=95:5 (v/v)~65:35 (v/v)]にて精製し、目的物(3–6) (7.10g, 59%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.32 (1H, s), 7.24 (1H, s), 7.15–7.14 (1H, m), 5.56–5.53 (1H, m), 4.70–4.68 (1H, m), 4.66–4.63 (1H, m), 4.11–4.01 (2H, m), 3.94–3.90 (4H, m), 3.84–3.75 (1H, m), 3.73–3.68 (1H, m), 3.46–3.44 (2H, m), 3.18–3.14 (1H, m), 1.96–1.

8.8 (4H, m), 1.69–1.61 (2H, m), 1.02–0.92 (2H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 689 [81Br, (M+H)⁺], 687 [79Br, (M+H)⁺].

[0431] 工程6: (11aS)-8-[(5-ブロモペンチル)オキシ]-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-10-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-5, 11(10H, 11aH)-ジオン(3-7)

上記工程5にて得られた化合物(3-6)(2.00g, 2.91mmol)、4-メトキシフェニルボロン酸(0.884g, 5.82mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)(0.336g, 0.291mmol)、炭酸ナトリウム(1.23g, 11.6mmol)の混合物にトルエン(20mL)、エタノール(10mL)、水(10mL)を室温にて加えた。反応溶液を室温にて30分撹拌した後、反応溶液を酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧留去した。得られた残渣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=90:10(v/v)~50:50(v/v)]にて精製し、目的物(3-7)(1.71g, 91%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.38–7.37 (3H, m), 7.33 (1H, s), 7.25 (1H, s), 6.89–6.88 (2H, m), 5.56–5.54 (1H, m), 4.71–4.68 (1H, m), 4.65–4.62 (1H, m), 4.09–4.04 (2H, m), 3.96–3.91 (4H, m), 3.85–3.66 (5H, m), 3.46–3.45 (2H, m), 3.16–3.12 (1H, m), 1.99–1.94 (4H, m), 1.69–1.64 (2H, m), 1.00–0.98 (2H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 647 [81Br, (M+H)⁺], 645 [79Br, (M+H)⁺].

[0432] 工程7: (11a S) - 8 - [(5 - ブロモペンチル) オキシ] - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 1, 11a - ジヒドロ - 5H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 5 - オン (3 - 8)

上記工程6にて得られた化合物 (3 - 7) (0.789 g, 1.22 mmol) をエタノール (10 mL)、テトラヒドロフラン (10 mL) に溶解し、2.0 Mの水素化ホウ素リチウムテトラヒドロフラン溶液 (6.11 mL, 12.2 mmol) を0℃にて加え、0℃にて3時間攪拌した。反応溶液に水を加え、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た。減圧留去し、得られた残渣をジクロロメタン (10 mL)、エタノール (20 mL)、水 (10 mL) に溶解し、シリカゲル (4 g) を室温にて加え、室温で4日間攪拌した。シリカゲルをろ過により除き、水を加え、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た。減圧留去し、得られた残渣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 = 60:40 (v/v) ~ 25:75 (v/v)] にて精製し、目的物 (3 - 8) (0.496 g, 81%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.90 - 7.89 (1H, m), 7.53 (1H, s), 7.40 - 7.40 (1H, m), 7.35 - 7.34 (2H, m), 6.92 - 6.90 (2H, m), 6.83 - 6.81 (1H, m), 4.43 - 4.40 (1H, m), 4.13 - 4.06 (2H, m), 3.96 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.61 - 3.57 (1H, m), 3.47 - 3.36 (3H, m), 2.00 - 1.92 (4H, m), 1.67 - 1.63 (2H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 501 [81Br, (M+H)⁺], 499 [79Br, (M+H)⁺].

[0433] 工程8: (11a S) - 8 - [(5 - ブロモペンチル) オキシ] - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 1, 10, 11, 11a - テトラヒドロ - 5H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 5 - オン (3 - 9)

上記工程7にて得られた化合物(3-8) (0.496 g, 0.992 mmol) のジクロロメタン(20 mL) 溶液にナトリウムトリアセトキシボロヒドリド(0.421 g, 1.99 mmol) を0℃にて加えた。室温にて2時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧留去した後、得られた残渣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=60：40 (v/v) ~ 25：75 (v/v)] にて精製し、目的物(3-9) (0.426 g, 86%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.53–7.53 (2H, m), 7.32–7.30 (2H, m), 6.89–6.87 (2H, m), 6.05 (1H, s), 4.33–4.27 (2H, m), 4.00–3.98 (2H, m), 3.86 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.57–3.55 (2H, m), 3.42–3.38 (3H, m), 2.76–2.72 (1H, m), 1.96–1.88 (4H, m), 1.65–1.62 (2H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 503 [81Br, (M+H)⁺], 501 [79Br, (M+H)⁺].

[0434] 工程9：プロプ-2-エン-1-イル (11aS) -8-[(5-ブromoペンチル) オキシ] -7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル) -5-オキソ-11, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4] ベンゾジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート(3-10)

上記工程8にて得られた化合物(3-9) (0.426 g, 0.849 mmol) のジクロロメタン(30 mL) 溶液に、ピリジン(0.102 mL, 1.27 mmol)、クロロギ酸アリル(0.374 mL, 3.54 mmol) を0℃にて加え、0℃にて15分間攪拌した。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、得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣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

0 : 10 (v/v) ~ 50 : 50 (v/v)] にて精製し、目的物 (3-10) (0.465 g, 94%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.38 (1H, s), 7.31-7.29 (2H, m), 7.26-7.25 (1H, m), 6.89-6.87 (2H, m), 6.71 (1H, s), 5.80-5.78 (1H, m), 5.14-5.11 (2H, m), 4.65-4.62 (1H, m), 4.39-4.26 (3H, m), 4.03-4.01 (2H, m), 3.92 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.66-3.64 (1H, m), 3.46-3.44 (2H, m), 3.30-3.27 (1H, m), 2.72-2.68 (1H, m), 1.96-1.88 (4H, m), 1.68-1.60 (2H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 587 [81Br, (M+H)⁺], 585 [79Br, (M+H)⁺].

[0435] 工程10 : N- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' - {tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7'-メトキシ-8' - { [5- ({ (11a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-10- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (3-11)

実施例10-1 工程10にて得られた化合物 (1-11) (0.130 g, 0.161 mmol) と上記工程9にて得られた化合物 (3-10) (0.104 g, 0.177 mmol,) のN, N-ジメチルホルムアミド (3 mL) 溶液に炭酸カリウム (0.0266 g, 0.193 mmol) を室温

にて加え、室温にて一晩攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去した後、得られた残渣をNH₂-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＝70：30（v/v）～0：100（v/v）〕にて精製し、目的物（3-11）（0.184 g, 87%）を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.76 (1H, s), 7.58–7.56 (2H, m), 7.39 (1H, s), 7.32–7.30 (2H, m), 7.26–7.24 (2H, m), 7.19–7.17 (3H, m), 6.90–6.88 (2H, m), 6.78 (1H, s), 6.68–6.66 (1H, m), 6.37 (1H, s), 5.99–5.93 (3H, m), 5.34–5.20 (6H, m), 4.66–4.01 (11H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.78–3.54 (9H, m), 3.31–3.28 (2H, m), 2.73–2.69 (1H, m), 2.38–2.35 (1H, m), 2.19–2.13 (1H, m), 1.82–1.80 (2H, m), 1.46–1.29 (6H, m), 0.98–0.90 (6H, m), 0.83 (9H, s), 0.69–0.63 (4H, m), 0.19–0.16 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z: 1312 (M+H) +

[0436] 工程11: N-〔(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-
 L-バリル-N-〔4-〔(〔(11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-
 -メトキシ-8'-〔5-〔(〔(11aS)-7-メトキシ-2-(4-
 -メトキシフェニル)-5-オキソ-10-〔(プロプ-2-エン-1-イル
 オキシ)カルボニル]-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-
 ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ)ペ
 ンチル}オキシ)-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1'H-
 スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベン
 ゾジアゼピン]-10' (5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]
 フェニル}-L-アラニンアミド (3-12)

上記工程10にて得られた化合物(3-11) (0.1837g, 0.140mmol)と酢酸(0.048mL, 0.840mmol)のテトラヒドロフラン(5.00mL)溶液に1mol/Lのテトラブチルアンモニウムフロリド テトラヒドロフラン溶液(0.700mL, 0.700mmol)を室温にて加え、室温にて3時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー[クロロホルム：メタノール=99.5：0.5(v/v)～95：5(v/v)]にて精製し、目的物(3-12) (0.178g、定量的)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.86 (1H, s), 7.60–7.59 (2H, m), 7.39 (1H, s), 7.32–7.20 (7H, m), 6.90–6.88 (2H, m), 6.78 (1H, s), 6.68 (1H, s), 6.38 (1H, s), 5.90–5.87 (3H, m), 5.39–5.22 (6H, m), 4.72–4.02 (11H, m), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.70–3.63 (6H, m), 3.32–3.29 (3H, m), 2.73–2.69 (1H, m), 2.43–2.40 (1H, m), 2.12–2.06 (1H, m), 1.77–1.74 (2H, m), 1.39–1.25 (6H, m), 0.96–0.89 (6H, m), 0.73–0.66 (4H, m).

MS (APCI、ESI) m/z: 1198 (M+H) +

[0437] 工程12: L-バリル-N-{4-[({[(11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[5-{[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,

1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (3-13)

上記工程11にて得られた化合物(3-12) (0.140 mmol) のジクロロメタン(2 mL) 溶液に、室温にてピロリジン(0.0579 mL, 0.700 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン) パラジウム(0) (0.0162 g, 0.0140 mmol) を加え、室温にて15分攪拌した。減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー [クロロホルム: メタノール=99.5:0.5 (v/v) ~92.5:7.5 (v/v)] にて精製し、目的物(3-13) (0.143 g, 99%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 9.12 (1H, s), 7.94-7.92 (1H, m), 7.57-7.53 (4H, m), 7.33-7.31 (2H, m), 7.20-7.18 (3H, m), 6.90-6.88 (2H, m), 6.36 (1H, s), 6.07 (1H, s), 5.91-5.88 (1H, m), 5.47-5.44 (1H, m), 5.21-5.13 (1H, m), 4.66-4.58 (3H, m), 4.32 (1H, s), 4.03-3.49 (17H, m), 3.38-3.29 (4H, m), 3.15-3.14 (1H, m), 2.77-2.73 (1H, m), 2.57 (2H, s), 2.43-2.40 (1H, m), 2.32-2.27 (1H, m), 1.81-1.39 (8H, m), 0.98-0.96 (3H, m), 0.85-0.83 (3H, m), 0.75-0.62 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z: 1030 (M+H) +

[0438] 工程13: N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[(11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ

−1H−ピロロ[2, 1−c][1, 4]ベンゾジアゼピン−8−イル]オキシ}ペンチル)オキシ]−5′−オキソ−11′, 11a′−ジヒドロ−1′H−スピロ[シクロプロパン−1, 2′−ピロロ[2, 1−c][1, 4]ベンゾジアゼピン]−10′(5′H)−イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}−L−アラニンアミド(3−14)

実施例10−2工程1にて得られた化合物(2−2)(0.0640g, 0.153mmol)、N−エトキシカルボニル−2−エトキシ−1, 2−ジヒドロキノリン(0.0446g, 0.180mmol)の混合物にジクロロメタン(2mL)を室温にて加え、室温にて15分撹拌した。反応溶液に上記工程12にて得られた化合物(3−13)(0.143g, 0.139mmol)のジクロロメタン(2mL)溶液を加え、室温にて五時間撹拌した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィークロロホルム：メタノール=99.5：0.5(v/v)~92.5：7.5(v/v)]で精製し、目的物(3−14)(0.103g, 52%)を得た。

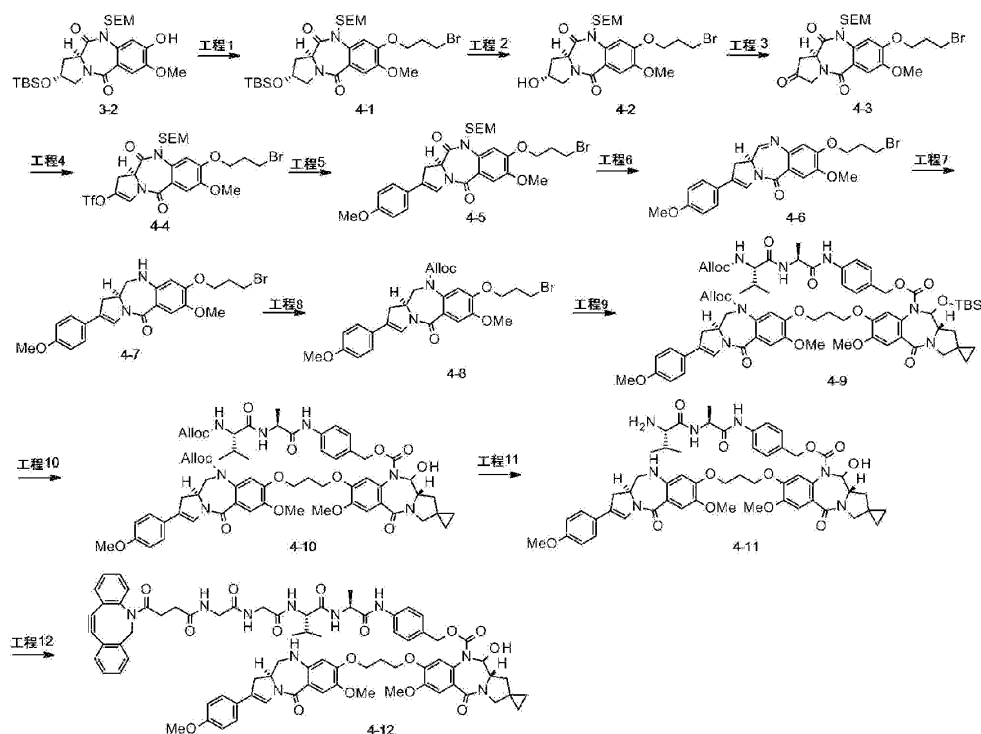
¹H−NMR(DMSO−D₆) δ: 9.93(1H, s), 8.21−8.16(2H, m), 8.07−8.04(1H, m), 7.83−7.64(2H, m), 7.60−7.55(3H, m), 7.51−7.28(10H, m), 7.19−7.16(2H, m), 7.10−7.04(1H, m), 6.92−6.90(2H, m), 6.76−6.70(1H, m), 6.39(1H, s), 5.77−5.75(1H, m), 5.21−5.18(1H, m), 5.03−4.99(1H, m), 4.82−4.79(1H, m), 4.37−4.35(1H, m), 4.21−4.20(2H, m), 4.02−3.24(26H, m), 3.16−3.13(1H, m), 2.79−2.59(2H, m), 2.39−2.28(2H, m),
2.05−1.97(2H, m), 1.91−1.77(4H, m), 1.57−1.54(3H, m), 1.28−1.23(3H, m),

0.85–0.80 (6H, m), 0.67–0.61 (4H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 1431 (M+H)⁺

[実施例10–4：薬物リンカー2]

[0439] [化56]



[0440] 工程1：(2R, 11aS)–8–(3–ブロモプロポキシ)–2–{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}–7–メトキシ–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–2,3–ジヒドロ–1H–ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン–5,11(10H, 11aH)–ジオン(4-1)

実施例10–3工程1にて得られた化合物(3-2)(5.06g, 9.67mmol)と1,3–ジブロモプロパン(4.93mL, 48.4mmol)を、実施例10–3工程2と同様に反応させ、目的物(4-1)(4.85g, 78%)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.35(1H, s), 7.26(1H,

s), 5.52–5.50 (1H, m), 4.65–4.63 (1H, m), 4.61–4.55 (1H, m), 4.25–4.14 (3H, m), 3.92 (3H, s), 3.82–3.62 (5H, m), 3.57–3.54 (1H, m), 2.86–2.84 (1H, m), 2.41–2.39 (2H, m), 2.06–1.99 (1H, m), 1.03–0.97 (2H, m), 0.87 (9H, s), 0.10 (6H, s), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 645 [81Br, (M+H)⁺], 643 [79Br, (M+H)⁺].

[0441] 工程2: (2R, 11aS)–8–(3-ブロモプロポキシ)–2-ヒドロキシ–7-メトキシ–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–2, 3-ジヒドロ–1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン–5, 11 (10H, 11aH)–ジオン (4–2)

上記工程1にて得られた化合物(4–1) (4.85g, 7.54mmol)を、実施例10–3工程3と同様に反応させ、目的物(4–2) (4.05g, 定量的)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.35 (1H, s), 7.26 (1H, s), 5.53–5.51 (1H, m), 4.66–4.61 (2H, m), 4.32–4.30 (1H, m), 4.21–4.16 (2H, m), 3.91–3.85 (4H, m), 3.82–3.74 (1H, m), 3.71–3.59 (4H, m), 2.99–2.96 (1H, m), 2.43–2.37 (2H, m), 2.15–2.09 (2H, m), 1.04–0.96 (2H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 531 [81Br, (M+H)⁺], 529 [79Br, (M+H)⁺].

[0442] 工程3: (11aS)–8–(3-ブロモプロポキシ)–7-メトキシ–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン–2, 5, 11 (3H, 10H,

11aH) - トリオン (4-3)

上記工程2にて得られた化合物(4-2) (7.54 mmol) を、実施例10-3工程4と同様に反応させ、目的物(4-3) (3.73 g, 93%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.34 (1H, s), 7.29 (1H, s), 5.56-5.53 (1H, m), 4.72-4.69 (1H, m), 4.67-4.61 (1H, m), 4.23-4.17 (3H, m), 3.97-3.88 (4H, m), 3.82-3.75 (1H, m), 3.74-3.56 (4H, m), 2.82-2.77 (1H, m), 2.43-2.38 (2H, m), 1.06-0.94 (2H, m), 0.08-0.00 (9H, m).

[0443] 工程4: (11aS) - 8 - (3-ブロモプロポキシ) - 7-メトキシ-5,11-ジオキソ-10- {[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル} - 5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-2-イル トリフルオロメタンスルフォネート (4-4)

上記工程3にて得られた化合物(4-3) (3.73 g, 7.08 mmol) を、実施例10-3工程5と同様に反応させ、目的物(4-4) (3.27 g, 70%)を得た。

[0444] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.33 (1H, s), 7.29 (1H, s), 7.15-7.15 (1H, m), 5.56-5.54 (1H, m), 4.70-4.65 (2H, m), 4.21-4.18 (2H, m), 3.94-3.91 (4H, m), 3.81-3.79 (1H, m), 3.70-3.64 (3H, m), 3.19-3.15 (1H, m), 2.47-2.38 (2H, m), 1.02-1.00 (2H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 661 [81Br, (M+H)⁺], 659 [79Br, (M+H)⁺].

[0445] 工程5：(11a S)－8－(3－ブロモプロポキシ)－7－メトキシ－2－(4－メトキシフェニル)－10－{[2－(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}－1H－ピロロ[2, 1－c][1, 4]ベンゾジアゼピン－5, 11(10H, 11aH)－ジオン(4－5)

上記工程4にて得られた化合物(4－4)(3.27g, 4.96mmol)を、実施例10－3工程6と同様に反応させ、目的物(4－5)(2.49g, 81%)を得た。

¹H-NMR(DMSO-D₆) δ: 7.49－7.47(2H, m), 7.40(1H, s), 7.31－7.24(2H, m), 6.93－6.88(2H, m), 5.33－5.31(1H, m), 5.25－5.18(1H, m), 4.81－4.80(1H, m), 4.23－4.10(2H, m), 3.85(3H, s), 3.77(3H, s), 3.70－3.59(3H, m), 3.52－3.40(2H, m), 3.15－3.08(1H, m), 2.33－2.27(2H, m), 0.86－0.74(2H, m), -0.07(9H, s).

MS(APCI, ESI) m/z: 619[81Br, (M+H)⁺], 617[79Br, (M+H)⁺].

[0446] 工程6：(11a S)－8－(3－ブロモプロポキシ)－7－メトキシ－2－(4－メトキシフェニル)－1, 11a－ジヒドロ－5H－ピロロ[2, 1－c][1, 4]ベンゾジアゼピン－5－オン(4－6)

上記工程5にて得られた化合物(4－5)(2.49g, 4.04mmol)を、実施例10－3工程7と同様に反応させ、目的物(4－6)(1.59g, 84%)を得た。

MS(APCI, ESI) m/z: 473[81Br, (M+H)⁺], 471[79Br, (M+H)⁺].

[0447] 工程7：(11a S)－8－(3－ブロモプロポキシ)－7－メトキシ－2－(4－メトキシフェニル)－1, 10, 11, 11a－テトラヒドロ－5H－ピロロ[2, 1－c][1, 4]ベンゾジアゼピン－5－オン(4－

7)

上記工程6にて得られた化合物(4-6) (1.59g, 3.38mmol)を、実施例10-3工程8と同様に反応させ、目的物(4-7) (1.39g, 87%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.54 (1H, s), 7.54-7.51 (1H, m), 7.32-7.29 (2H, m), 6.89-6.87 (2H, m), 6.10 (1H, s), 4.32-4.28 (2H, m), 4.14-4.13 (2H, m), 3.85 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.63-3.62 (2H, m), 3.57-3.55 (2H, m), 3.40-3.36 (1H, m), 2.76-2.72 (1H, m), 2.40-2.37 (2H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 475 [81Br , (M+H) $^+$], 473 [79Br , (M+H) $^+$].

[0448] 工程8: プロプ-2-エン-1-イル (11aS) -8-(3-ブロモプロポキシ)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-11, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート(4-8)

上記工程7にて得られた化合物(4-7) (1.40g, 0.295mmol)を、実施例10-3工程9と同様に反応させ、目的物(4-8) (0.885g, 54%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.34 (1H, s), 7.27-7.25 (2H, m), 7.22 (1H, s), 6.86-6.84 (2H, m), 6.73 (1H, s), 5.76-5.74 (1H, m), 5.11-5.09 (2H, m), 4.62-4.59 (2H, m), 4.33-4.31 (1H, m), 4.16-4.13 (3H, m), 3.88 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.60-3.59 (3H, m), 3.27-3.23 (1H, m), 2.69-2.65 (1H, m), 2.37-2.34 (2H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 559 [81Br, (M+H)⁺], 557 [79Br, (M+H)⁺].

[0449] 工程9: N- {[(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル} -L-バリル-N-[4- ({[(11' aS) -11' - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7' -メトキシ-8' - (3- {[(11 aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-10- {[(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル} -5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド (4-9)

上記工程8にて得られた化合物 (4-8) (0.0381 g, 0.0683 mmol) と実施例10-1工程10で得られた化合物 (1-11) (0.0552 g, 0.0683 mmol) を、実施例10-3工程10と同様に反応させ、目的物 (4-9) (0.0712 g, 81%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1284 (M+H)⁺.

[0450] 工程10: N- {[(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル} -L-バリル-N-[4- ({[(11' aS) -11' -ヒドロキシー-7' -メトキシ-8' - (3- {[(11 aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-10- {[(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル} -5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド (4-10)

上記工程 9 にて得られた化合物 (4-9) (0.0712 g, 0.0554 mmol) を、実施例 10-3 工程 11 と同様に反応させ、目的物 (4-10) (0.0671 g, 定量的) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1170 (M+H) +.

[0451] 工程 11: L-バリル-N-[4-({[(11'-aS)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-{ [(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2,1-c] [1,4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ)-5'-オキソ-11',11'a-ジヒドロ-1'H,3'H-スピロ [シクロプロパン-1,2'-ピロロ [2,1-c] [1,4] ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボニル] オキシ} メチル) フェニル]-L-アラニンアミド (4-11)

上記工程 10 にて得られた化合物 (4-10) (0.0571 mmol) を、実施例 10-3 工程 12 と同様に反応させ、目的物 (4-11) (0.0574 g, 99%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 9.16 (1H, s), 7.93-7.91 (1H, m), 7.55-7.52 (1H, m), 7.50-7.47 (3H, m), 7.35-7.32 (2H, m), 7.21 (1H, s), 7.13-7.11 (2H, m), 6.90-6.87 (2H, m), 6.40 (1H, s), 6.08 (1H, s), 5.90-5.87 (1H, m), 5.37-5.34 (1H, m), 4.73-4.53 (3H, m), 4.23-4.08 (5H, m), 3.89 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.78-3.72 (5H, m), 3.57-3.51 (3H, m), 3.38-3.30 (3H, m), 2.76-2.71 (1H, m), 2.36-2.24 (4H, m), 1.78-1.42 (6H, m), 1.00-0.98 (3H, m), 0.87-0.84 (3H, m), 0.74-0.62 (4H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 1002 (M+H) +.

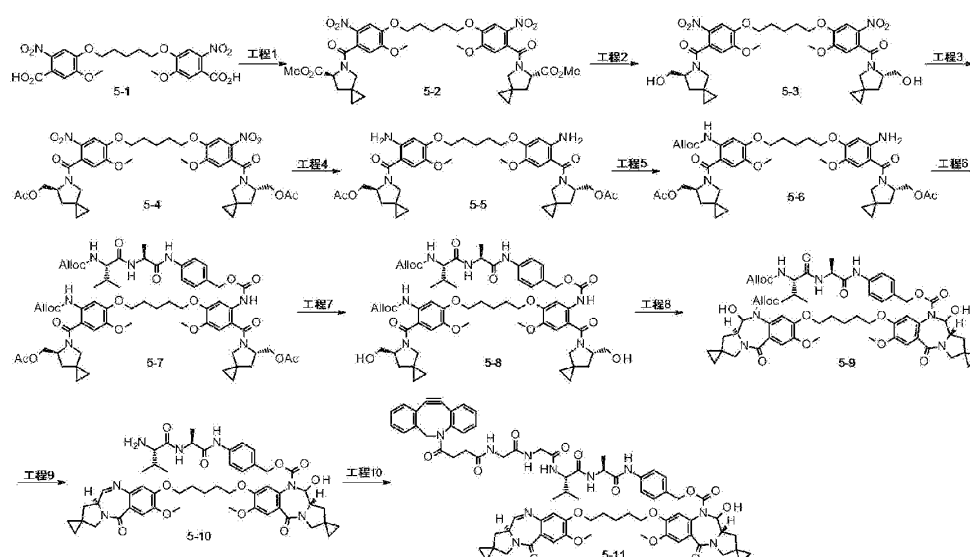
[0452] 工程12: N-[4-(1,1,2-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-({[(11'aS)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-{ [(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロポキシ)-5'-オキソ-11',11'a-ジヒドロ-1'H,3'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'H)-カルボニル]オキシ}メチル]フェニル]-L-アラニンアミド(4-12)

上記工程11にて得られた化合物(4-11)(0.189g, 0.189mmol)と実施例10-2工程1で得られた化合物(2-2)(0.087g, 0.207mmol)を、実施例10-3工程13と同様に反応させ、目的物(4-12)(0.169g, 64%)を得た。

[0453] MS(APCI,ESI) m/z: 1402 (M+H)+.

[実施例10-5:薬物リンカー3]

[0454] [化57]



[0455] 工程1：ジメチル（6S，6'S）-5，5'-{1，5-ペンタンジイルビス[オキシ（5-メトキシ-2-ニトロベンゼン-4，1-ジイル）カルボニル]}ビス（5-アザスピロ[2.4]ヘプタン-6-カルボキシレート）（5-2）

4，4'-[1，5-ペンタンジイルビス（オキシ）]ビス（5-メトキシ-2-ニトロ安息香酸）（5-1）（5.41g，10.9mmol，*Journal of Medicinal Chemistry* 2004，47，1161）のジクロロメタン（50mL）溶液に、0℃にて塩化オキサリル（5.63mL，65.7mmol）を加え、N，N-ジメチルホルムアミド（0.0844mL，1.09mmol）滴下した。反応溶液を室温まで昇温し、2時間攪拌した。減圧留去して得られた残渣をジクロロメタン（100mL）に溶解し、メチル（6S）-5-アザスピロ[2.4]ヘプタン-6-カルボキシレート塩酸塩（4.28g，24.1mmol，*Tetrahedron Letters* 2012，53，3847）とトリエチルアミン（6.07mL，43.8mmol）のジクロロメタン溶液（100mL）に窒素雰囲気下、-40℃で滴下した。反応溶液を0℃に昇温して2時間攪拌した。反応混合物に1規定塩酸（100mL）を加え、有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、目的物（5-2）（8.40g、定量的）を得た。

¹H-NMR（DMSO-D₆） δ ：7.71（2H，s），6.88（2H，s），4.63（2H，m），4.15-4.12（4H，m），3.94（6H，s），3.71（6H，s），3.25（2H，m），3.10（2H，m），2.31-2.28（2H，m），1.90-1.83（6H，m），1.60-1.58（2H，m），0.71-0.49（8H，m）。

MS（APCI、ESI）*m/z*：769（M+H）⁺。

[0456] 工程2：{1，5-ペンタンジイルビス[オキシ（5-メトキシ-2-ニ

トロベンゼン-4, 1-ジイル)] } ビス { [(6S) -6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] メタノン } (5-3)

上記工程1にて得られた化合物(5-2) (8. 40 g, 10. 9 mmol) のテトラヒドロフラン (100 mL) 溶液に、水素化ほう素リチウム (714 mg, 32. 8 mmol) を加え、0℃にて30分攪拌し、室温に昇温して1時間攪拌した。0℃にて1規定塩酸を加えた後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下に溶媒留去して、目的物(5-3) (7. 70 g, 99%) を得た。

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ : 7. 67 (2H, s), 7. 05 (2H, s), 4. 86-4. 74 (2H, m), 4. 22-4. 12 (6H, m), 3. 92 (6H, s), 3. 83-3. 73 (2H, m), 3. 62-3. 51 (2H, m), 3. 29 (1H, m), 3. 11 (2H, m), 2. 96 (1H, m), 2. 12-2. 03 (2H, m), 1. 82-1. 77 (6H, m), 1. 59-1. 56 (2H, m), 0. 67-0. 41 (8H, m) .

MS (APCI, ESI) m/z : 713 (M+H) +.

[0457] 工程3 : ペンタン-1, 5-ジイルビス [オキシ (5-メトキシ-2-ニトロベンゼン-4, 1-ジイル) カルボニル (6S) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプタン-5, 6-ジイルメタンジイル] ジアゼテート (5-4)

上記工程2にて得られた化合物(5-3) (7. 70 g, 10. 8 mmol) をピリジン (20 mL) 及び無水酢酸 (10 mL, 105. 9 mmol) に溶解して、室温にて攪拌した。減圧留去して、目的物(5-4) (8. 38 g, 97%) を得た。

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ : 7. 68 (2H, s), 7. 03 (2H, s), 4. 47-4. 46 (2H, m), 4. 36-4. 27 (4H, m), 4. 13-4. 11 (6H, m), 3. 92 (6H, s), 3. 16 (2H, m), 2. 98 (2H, m), 2. 17 (1H, m), 2. 06 (

6 H, s), 1.84 (4 H, m), 1.68 (1 H, m), 1.58 (2 H, m), 0.64–0.45 (8 H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 797 (M+H) +.

[0458] 工程4: 1, 5-ペンタンジイルビス [オキシ (2-アミノ-5-メトキシベンゼン-4, 1-ジイル) カルボニル (6S) -5-アザスピロ [2.4] ヘプタン-5, 6-ジイルメタンジイル] ジアセテート (5-5)

上記工程3にて得られた化合物 (5-4) (8.28 g, 10.4 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (100 mL) 溶液に、5%パラジウム炭素 (54%水分、1.00 g) を加えた後、反応溶液を水素雰囲気下、室温にて6時間激しく攪拌した。セライトろ過した後、ろ液を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム: メタノール=100:0 (v/v) ~90:10 (v/v)] にて精製し、目的物 (5-5) (5.05 g, 66%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 6.66 (2 H, s), 6.36 (2 H, s), 5.11 (4 H, s), 4.49 (2 H, s), 4.19 (4 H, m), 3.90 (4 H, m), 3.62 (6 H, s), 3.48–3.46 (2 H, m), 3.33 (2 H, s), 3.23–3.20 (2 H, m), 2.01 (6 H, s), 1.78–1.74 (6 H, m), 1.55 (2 H, m), 0.61–0.58 (4 H, m), 0.49–0.48 (4 H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 737 (M+H) +.

[0459] 工程5: { (6S) -5-[4-({5-[4-({ (6S) -6-[(アセチルオキシ) メチル] -5-アザスピロ [2.4] ヘプト-5-イル} カルボニル) -5-アミノ-2-メトキシフェノキシ] ペンチル} オキシ) -5-メトキシ-2-{ [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] アミノ} ベンゾイル] -5-アザスピロ [2.4] ヘプト-6-イル} メチル アセテート (モノアリルオキシカルボニル体) (5-6)

上記工程4にて得られた化合物 (5-5) (5.05 g, 6.85 mmol)

l) のジクロロメタン (100 mL) 溶液に、ピリジン (1.10 mL, 13.7 mmol) を加え、窒素雰囲気下、 -78°C にてクロロギ酸アリル (0.725 mL, 6.85 mmol) を加え、2時間攪拌した。減圧留去して得られた残渣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=70：30 (v/v) ~ 100：0 (v/v)、クロロホルム：メタノール=100：0 (v/v) ~ 90：10 (v/v)] にて精製し、目的物であるビスアリルオキシカルボニル体 (5-6b) (1.36 g, 22%) と、モノアリルオキシカルボニル体 (5-6) (2.63 g, 47%) を得た。

[0460] ペンタン-1, 5-ジイルビス [オキシ (5-メトキシ-2- { [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] アミノ} ベンゼン-4, 1-ジイル) カルボニル (6S) -5-アザスピロ [2.4] ヘプタン-5, 6-ジイルメタンジイル] ジアセテート (ビスアリルオキシカルボニル体) (5-6b) :

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 9.14 (2H, s), 7.14 (2H, s), 6.85 (2H, s), 5.94 (2H, m), 5.33 (2H, m), 5.21 (2H, m), 4.55 (4H, m), 4.47 (1H, s), 4.23 (3H, s), 3.96 (4H, m), 3.74 (6H, s), 3.34 (6H, s), 3.31 (2H, m), 3.21 (2H, m), 2.04 (6H, s), 1.79 (4H, m), 1.67 (2H, m), 1.56 (2H, m), 0.56-0.48 (8H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 905 (M+H)+.

モノアリルオキシカルボニル体 (5-6) :

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6)
 δ : 9.14 (1H, s), 7.14 (1H, s), 6.85 (1H, s), 6.65 (1H, s), 6.35 (1H, s), 5.95 (1H, m), 5.33 (1H, m), 5.22 (1H, m), 5.11 (2H, s), 4.55 (2H, m), 4.48 (2H, s), 4.23-4.14 (4H,

m), 3.96 (2H, m), 3.90 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.49 (1H, m), 3.38–3.30 (4H, m), 3.21 (1H, m), 2.04 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.77 (5H, m), 1.68 (1H, m), 1.56 (2H, m), 0.63–0.48 (8H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 821 (M+H) +.

[0461] 工程6: N-[(2-プロペン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[(2-[(6S)-6-[(アセチルオキシ)メチル]-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル)カルボニル]-5-[(5-[(4-[(6S)-6-[(アセチルオキシ)メチル]-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル)カルボニル]-2-メトキシ-5-{[(2-プロペン-1-イルオキシ)カルボニル]アミノ}フェノキシ)ペンチル)オキシ]-4-メトキシフェニル)カルバモイル)オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド (5-7)

上記工程5で得られたモノアリルオキシカルボニル体 (5-6) (2.00g, 2.44mmol) と N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]-L-アラニンアミド (1.10g, 2.92mmol, WO2011130598) を、実施例10-1工程6と同様に反応させ、目的物 (5-7) (2.64g, 89%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 10.02 (1H, s), 9.14 (2H, s), 8.18 (1H, m), 7.59 (2H, m), 7.33 (2H, m), 7.27 (1H, m), 7.14 (2H, s), 6.85 (2H, s), 5.99–5.86 (2H, m), 5.31 (2H, n), 5.19 (2H, m), 5.03 (2H, s), 4.55 (2H, m), 4.48 (2H, n), 4.41 (2H, m), 4.23–4.21 (3H, m), 3.94–3.91 (4H, m), 3.88–3.86 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.34 (4H, s), 3.3

2-3. 30 (2H, m), 3. 20-3. 18 (2H, m), 2. 03 (6H, s), 1. 96 (1H, m), 1. 79 (4H, s), 1. 66 (1H, m), 1. 55 (2H, s), 1. 30 (3H, m), 0. 88 (3H, m), 0. 83 (3H, m), 0. 54-0. 49 (8H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 1224 (M+H) +.

[0462] 工程7: N-[(2-プロペン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリン-N-[4-({[(2-{ [(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-5-{ [5-(4-{ [(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-2-メトキシ-5-{ [(2-プロペン-1-イルオキシ)カルボニル]アミノ}フェノキシ)ペンチル]オキシ}-4-メトキシフェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]-L-アラニンアミド (5-8)

上記工程6にて得られた化合物(5-7)(2. 64g, 2. 16mmol)のメタノール(10mL)溶液に、炭酸カリウム(1. 49g, 10. 8mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液(100mL)を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧留去して、目的物(5-8)(2. 21g, 90%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 10. 04 (1H, s), 9. 18 (1H, s), 8. 18 (1H, m), 7. 59 (2H, m), 7. 33 (2H, m), 7. 26 (1H, m), 7. 22 (1H, s), 7. 14 (2H, s), 6. 89 (2H, s), 5. 98-5. 86 (2H, m), 5. 31 (2H, m), 5. 19 (2H, m), 5. 04 (2H, s), 4. 80 (2H, m), 4. 55 (2H, m), 4. 48 (2H, m), 4. 41 (1H, m), 4. 26 (2H, s), 3. 96-3. 94 (4H, m), 3. 90-3. 85 (1H, m), 3. 74 (6H, s), 3. 59 (2H, m), 3. 33 (6H, s), 3. 09 (1H, m), 1. 93-1. 83

(8H, m), 1.57–1.54 (2H, m), 1.30 (3H, m), 0.88 (3H, m), 0.83 (3H, m), 0.52–0.43 (8H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 1140 (M+H) +.

[0463] 工程8: N-[(2-プロペン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バ
リル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-8' - {
[5- ({ (11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -
オキソ-10' - [(2-プロペン-1-イルオキシ) カルボニル] -5'
, 10', 11', 11a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロ
パン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'
-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -7' -メトキシ-5' -オキソ-
11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'
-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H)
-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (5-9)

上記工程7にて得られた化合物 (5-8) (2.03 g, 1.78 mmol) のジクロロメタン (50 mL) 溶液に、デスマーチンペルヨージナン (1.59 g, 3.74 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム: メタノール = 100:0 (v/v) ~ 90:10 (v/v)] にて精製し、目的物 (5-9) (2.05 g, 定量的) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.99 (1H, s), 8.16 (1H, m), 7.54 (2H, m), 7.32–7.22 (3H, m), 7.08–7.04 (2H, m), 6.80–6.72 (2H, m), 6.55 (2H, s), 5.94–5.86 (2H, m), 5.75 (2H, m), 5.31–5.04 (2H, m), 4.81 (1H, m), 4.62 (1H

, m), 4.48–4.38 (4H, m), 4.00–3.87 (4H, m), 3.79–3.76 (7H, m), 3.54 (2H, m), 3.42–3.40 (2H, m), 3.33 (4H, s), 3.14 (2H, m), 2.35 (2H, m), 1.80–1.78 (4H, m), 1.59–1.56 (4H, m), 1.29 (3H, m), 0.87 (3H, m), 0.83 (3H, m), 0.70–0.59 (8H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 1136 (M+H) +.

[0464] 工程9: L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (5-10)

上記工程8にて得られた化合物 (5-9) (2.05g, 1.80mmol) を、実施例10-3工程12と同様に反応させ、目的物 (5-10) (1.02g, 60%) を得た。

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ : 10.08 (1H, s), 7.57 (2H, m), 7.32–7.20 (3H, m), 7.05 (2H, s), 6.68–6.60 (3H, m), 5.74 (1H, m), 4.99–4.58 (4H, m), 3.99–3.94 (4H, m), 3.78–3.73 (6H, m), 3.66–3.38 (4H, m), 3.15–3.01 (3H, m), 2.40–2.34 (3H, m), 1.89–1.81 (6H, m), 1.57–1.53 (4H, m), 1.28 (3H, m), 0.88 (3H, m), 0.78 (3H, m), 0.64–0.55 (8H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 950 (M+H) +.

[0465] 工程10: N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾ

シン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-
 -バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7'
 -メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7' -メトキシ-5' -
 オキソ-5' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1
 , 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル
] オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒド
 ロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1,
 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキ
 シ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (5-11)

上記工程9にて得られた化合物 (5-10) (0.710g, 0.747
 mmol) と実施例10-2工程1にて得られた化合物 (2-2) (0.3
 13g, 0.747mmol) をジクロロメタン (1.5mL) とメタノール
 (0.1mL) の混合溶媒に溶解した。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.
 264g, 0.897mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。減圧留
 去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホル
 ム:メタノール=100:0 (v/v) ~80:20 (v/v)] にて精製
 し目的物 (5-11) (0.671g, 66%) を得た。

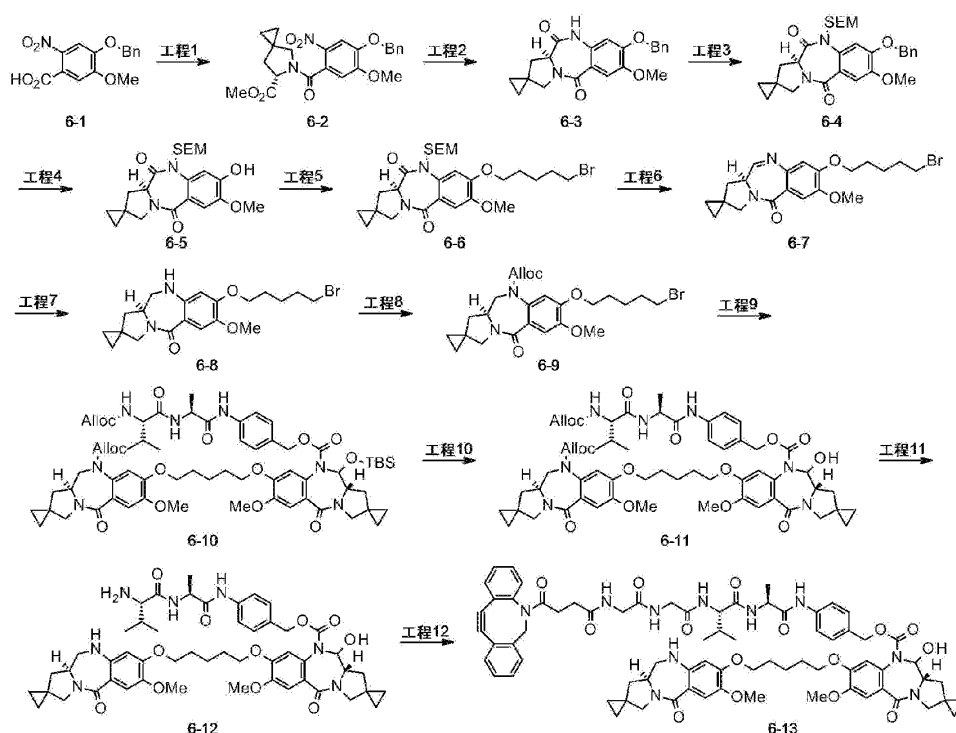
¹H-NMR (DMSO-D₆) δ: 9.91 (1H, s), 8.32 (1
 H, s), 8.23-7.91 (3H, m), 7.81-7.19 (14H,
 m), 7.04 (1H, m), 6.80-6.62 (3H, m), 5.7
 7-5.75 (1H, m), 5.20 (1H, m), 5.01 (1H, m)
 , 4.79 (1H, m), 4.46-4.35 (1H, m), 4.04 (4
 H, m), 3.86-3.38 (18H, m), 3.22-3.15 (2H,
 m), 2.67-2.63 (1H, m), 2.46-2.23 (3H, m)
), 2.09-1.91 (2H, m), 1.80-1.78 (5H, m),
 1.57 (3H, m), 1.27 (3H, s), 1.11-1.04 (1H,
 m), 0.87-0.79 (6H, m), 0.63-0.55 (6H, m)

).

MS (APCI、ESI) m/z : 1351 (M+H)⁺.

[実施例10-6:薬物リンカー4]

[0466] [化58]



[0467] 工程1: メチル(6S)-5-[4-(ベンジルオキシ)-5-メトキシ-2-ニトロベンゾイル]-5-アザスピロ[2.4]ヘプタン-6-カルボキシレート(6-2)

4-(ベンジルオキシ)-5-メトキシ-2-ニトロ安息香酸(6-1)(6.07g, 20.0mmol, Tetrahedron 1995, 51, 5617)、N,N-ジメチルホルムアミド(1.08mL, 13.9mmol)のジクロロメタン(100mL)溶液に、氷冷下にて塩化オキサリル(3.43mL, 40.0mmol)を5分間かけて滴下した。室温にて反応溶液を5時間攪拌した後、減圧留去し、得られた残渣をジクロロメタン(20mL)に溶解させ、減圧留去した。この操作を3回繰り返した後に、残渣をジクロロメタン(5mL)に懸濁させ、これに過剰のジエチルエー

テルとヘキサンを加え、ろ過し、減圧下に乾燥させることにより粗酸クロリドを得た。得られた酸クロリドをジクロロメタンに溶解させ、 -40°C （ドライアイス-アセトニトリル浴）に冷却し、メチル（6S）-5-アザスピロ[2.4]ヘプタン-6-カルボキシレート塩酸塩（4.22 g, 22.0 mmol, Tetrahedron Letters 2012, 53, 3847）、トリエチルアミン（3.36 mL, 24.2 mmol）を徐々に加えた。反応混合物を一晩かけて室温にまで昇温した。反応混合物に1規定塩酸を加え、反応混合物をジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去して得られた残渣を、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＝100：0～50：50］にて精製し、目的物（6-2）（6.55 g, 80%）を得た。

[0468] MS (APCI, ESI) m/z : 441 ($M+H$) +

[0469] 工程2：(11a'S)-8'-(ベンジルオキシ)-7'-メトキシ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-5', 11'-(10'H, 11a'H)-ジオン（6-3）

上記工程1にて得られた化合物（6-2）（6.55 g, 16.0 mmol）のエタノール（150 mL）、テトラヒドロフラン（150 mL）溶液に窒素雰囲気下、ラネーニッケル（7.00 g）を加えた。反応混合物にヒドラジン-水和物（7 mL）を加え、 50°C まで徐々に昇温した。 50°C にて2時間攪拌した後にラネーニッケル（3.00 g）、ヒドラジン-水和物（3 mL）を加え、1時間攪拌した。反応混合物にTHF（100 mL）を加えて、セライトろ過した。減圧留去して得られた残渣を、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＝100：0～25：75］にて精製し、目的物（6-3）（4.42 g, 73%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.82 (1H, s), 7.48 (1H, s), 7.42-7.35 (4H, m), 7.32-7.31 (1H, m)

, 6.44 (1H, s), 5.16 (2H, s), 4.16–4.10 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.78–3.76 (1H, m), 3.39–3.37 (1H, m), 2.45–2.43 (1H, m), 2.24–2.21 (1H, m), 0.83–0.61 (4H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 379 (M+H) +

[0470] 工程3: (11a'S)–8'–(ベンジルオキシ)–7'–メトキシ–10'–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–1'H–スピロ[シクロプロパン–1, 2'–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン]–5', 11' (10'H, 11a'H)–ジオン(6–4)

上記工程2にて得られた化合物(6–3)(10.0g, 26.4mmol)のテトラヒドロフラン(150mL)溶液に–40℃にて、2.6mol/Lのノルマルブチルリチウムノルマルヘキサン溶液(12.0mL, 31.8mmol)をゆっくりと滴下した。反応溶液を–40℃にて15分間攪拌し後、2–(クロロメトキシ)エチルトリメチルシラン(5.57mL, 31.7mmol)をゆっくりと滴下した。反応溶液を室温にて3時間攪拌した後、水を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去して得られた残渣を、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=100:0~30:70]にて精製し、目的物(6–4)(11.8g, 88%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.45–7.44 (2H, m), 7.37–7.32 (4H, m), 7.28 (1H, s), 5.48–5.46 (1H, m), 5.21 (2H, s), 4.50–4.48 (1H, m), 4.22–4.20 (1H, m), 3.95 (3H, s), 3.73–3.70 (2H, m), 3.62–3.60 (1H, m), 3.41–3.38 (1H, m), 2.45–2.43 (1H, m), 2.23–2.20 (1H, m), 0.98–0.96 (2H, m), 0.83–0.68 (4H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI、ESI) m/z : 509 (M+H) +

[0471] 工程4: (11a' S) - 8' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 10' - { [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチル } - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 5', 11' (10' H, 11a' H) - ジオン (6-5)

上記工程3にて得られた化合物(6-4) (18.7 g, 36.8 mmol) のテトラヒドロフラン (50 mL)、エタノール (100 mL) 溶液に、窒素雰囲気下において5%のパラジウム炭素触媒 (5.00 g) を加えた。直ちに窒素風船を水素風船に付け替え、反応混合物を水素雰囲気下にて6時間攪拌した。反応混合物にクロロホルムを加えて希釈し、セライトろ過をした後、濾液を減圧留去して得られた残渣を、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 ~ 25: 75] にて精製し、目的物(6-5) (15.1 g, 98%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.38 (1H, s), 7.28 (1H, s), 6.01 (1H, s), 5.49-5.47 (1H, m), 4.70-4.68 (1H, m), 4.24-4.22 (1H, m), 3.96 (3H, s), 3.76-3.71 (2H, m), 3.66-3.64 (1H, m), 3.42-3.39 (1H, m), 2.47-2.45 (1H, m), 2.23-2.21 (1H, m), 1.01-0.99 (2H, m), 0.89-0.63 (4H, m), 0.03 (9H, s).

MS (APCI、ESI) m/z : 419 (M+H) +

[0472] 工程5: (11a' S) - 8' - [(5-ブロモベンチル) オキシ] - 7' - メトキシ - 10' - { [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチル } - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 5', 11' (10' H, 11a' H) - ジオン (6-6)

上記工程4にて得られた化合物にて得られた化合物(6-5) (2.77 g, 6.62 mmol) を、実施例10-3工程2と同様に反応させ、目的

物 (6-6) (3.31 g, 88%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.36 (1H, s), 7.25 (1H, s), 5.55 (1H, m), 4.65 (1H, m), 4.24–4.23 (1H, m), 4.11–4.03 (2H, m), 3.93 (3H, s), 3.85–3.78 (1H, m), 3.72–3.69 (2H, m), 3.46–3.39 (3H, m), 2.47–2.44 (1H, m), 2.25–2.22 (1H, m), 1.95–1.91 (4H, m), 1.67–1.59 (1H, m), 1.03–0.95 (2H, m), 0.90–0.85 (1H, m), 0.70–0.66 (4H, m), 0.05 (9H, s).

[0473] 工程6: (11a' S)–8'–[(5-ブロモペンチル)オキシ]–7'-メトキシ–1', 11a'–ジヒドロ–5' H–スピロ [シクロプロパン–1, 2'–ピロロ [2, 1–c] [1, 4] ベンゾジアゼピン]–5'–オン (6-7)

上記工程5にて得られた化合物 (6-6) (3.31 g, 5.83 mmol) を、実施例10–3工程7と同様に反応させ、目的物 (6-7) (1.11 g, 45%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.81 (1H, m), 7.53 (1H, s), 6.82 (1H, s), 4.13–4.06 (2H, m), 3.97 (3H, s), 3.88–3.83 (1H, m), 3.69 (1H, m), 3.52–3.39 (3H, m), 2.55–2.52 (1H, m), 2.06–1.89 (5H, m), 1.67–1.63 (2H, m), 0.76–0.72 (4H, m).

[0474] 工程7: (11a' S)–8'–[(5-ブロモペンチル)オキシ]–7'-メトキシ–1', 10', 11', 11a'–テトラヒドロ–5' H–スピロ [シクロプロパン–1, 2'–ピロロ [2, 1–c] [1, 4] ベンゾジアゼピン]–5'–オン (6-8)

上記工程6にて得られた化合物 (6-7) (2.56 g, 6.08 mmol)

l) を、実施例 10-3 工程 8 と同様に反応させ、目的物 (6-8) (1.15 g, 45%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.60 (1H, s), 6.07 (1H, s), 4.11-4.04 (1H, m), 3.99 (2H, m), 3.87-3.84 (1H, m), 3.85 (3H, s), 3.73 (1H, m), 3.58-3.53 (2H, m), 3.47-3.42 (3H, m), 2.03-1.78 (6H, m), 1.65-1.63 (2H, m), 0.77-0.56 (4H, m).

[0475] 工程 8: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S)-8'-[(5-ブロモペンチル)オキシ]-7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボキシレート (6-9)

上記工程 7 にて得られた化合物 (6-8) (1.15 g, 2.72 mmol) を、実施例 10-3 工程 9 と同様に反応させ、目的物 (6-9) (1.14 g, 82%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.23 (1H, s), 6.69 (1H, s), 5.79 (1H, s), 5.13-5.10 (2H, m), 4.68-4.66 (1H, m), 4.48-4.45 (2H, m), 4.01 (2H, m), 3.92 (3H, s), 3.76 (1H, m), 3.54-3.37 (3H, m), 2.39 (1H, m), 1.95-1.90 (4H, m), 1.68-1.61 (3H, m), 1.44 (1H, m), 0.75-0.66 (4H, m).

[0476] 工程 9: N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[(11a' S)-11'-{tert-ブチル(ジメチル)シリル}オキシ]-7'-メトキシ-8'-{[5-(11a' S)-7'-メトキシ-5'-オキソ-10'-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5', 10', 11', 11a'}

ーテトラヒドロ' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (6-10)

上記工程8にて得られた化合物 (6-9) (0.374 g, 0.737 mmol) と実施例10-1工程10にて得られた化合物 (1-11) (0.452 g, 0.56 mmol) を、実施例10-3工程10と同様に反応させ、目的物 (6-10) (0.589 g, 65%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1234 (M+H) +

[0477] 工程10: N- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8' - { [5- ({ (11a' S) -7'-メトキシ-5'-オキソ-10' - [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -5', 10', 11', 11a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -5'-オキソ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (6-11)

上記工程9にて得られた化合物 (6-10) (0.589 g, 0.477 mmol) を、実施例10-3工程11と同様に反応させ、目的物 (6-11) (0.382 g, 71%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.90 (1H, s), 7.55 (2H, m), 7.25-7.21 (2H, m), 6.74 (2H, m), 6.38 (1H, s), 5.90-5.87 (5H, m), 5.33-5.09 (8H, m), 4.66-4.60 (8H, m), 3.98-3.91 (10H

, m), 3.77-3.30 (12H, m), 2.42-2.36 (2H, m), 1.77-1.39 (6H, m), 0.91-0.70 (14H, m).

[0478] 工程11: L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5', 10', 11', 11a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (6-12)

上記工程10にて得られた化合物(6-11) (0.382g, 0.341mmol) を、実施例10-3工程12と同様に反応させ、目的物(6-12) (0.200g, 62%)を得た。

MS (APCI、ESI) m/z: 952 (M+H) +

[0479] 工程12: N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5', 10', 11', 11a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (6-13)

上記工程11にて得られた化合物(6-12) (0.0560g, 0.0

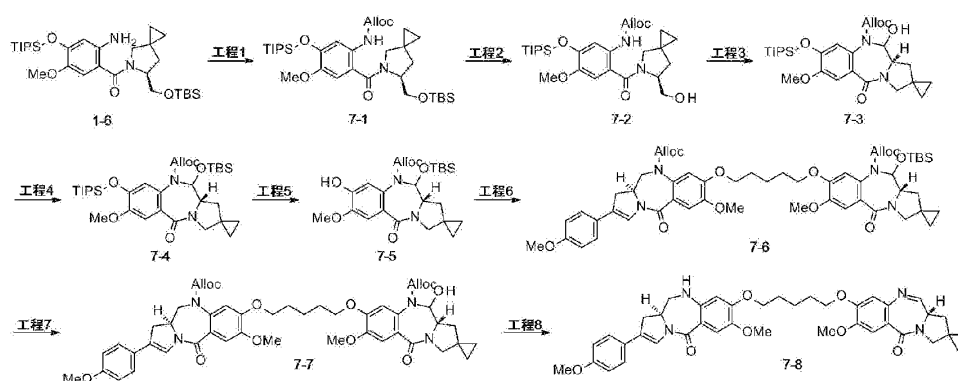
588 mmol) と実施例 10-2 工程 1 にて得られた化合物 (2-2) (0.022 g, 0.053 mmol) を、実施例 10-3 工程 13 と同様に反応させ、目的物 (6-13) (0.0500 g, 63%) を得た。

[0480] MS (APCI, ESI) m/z : 1354 (M+H) +

[薬物部分の合成]

[実施例 10-7 : 薬物 1]

[0481] [化59]



[0482] 工程 1 : プロパー 2-エン-1-イル (2- { [(6S) - 6- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) - 5-アザスピロ [2.4] ヘプト-5-イル] カルボニル} - 4-メトキシ-5- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバメート (7-1)

実施例 1 工程 5 にて得られた化合物 (1-6) (4.59 g, 8.15 mmol) を、実施例 10-3 工程 9 と同様に反応させ、目的物 (7-1) (4.86 g, 92%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.97 (1H, s), 7.77 (1H, s), 6.77 (1H, s), 5.97-5.94 (1H, m), 5.39-5.21 (2H, m), 4.67-4.59 (3H, m), 4.00-3.98 (1H, m), 3.74-3.66 (5H, m), 3.05-3.03 (1H, m), 2.30-2.28 (1H, m), 1.72-1.70 (1H, m), 1.30-1.27 (3H, m), 1.11-1.05 (18

H, m), 0.99–0.91 (9H, m), 0.61–0.53 (4H, m), 0.10–0.06 (6H, m). MS (APCI, ESI) m/z : 647 (M+H) +

[0483] 工程2：プロプ-2-エン-1-イル (2- { [(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル} -4-メトキシ-5- { [トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバメート (7-2)

上記工程1にて得られた化合物(7-1) (4.86g, 7.51mmol)を、実施例10-1工程7と同様に反応させ、目的物(7-2) (3.42g, 86%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.52 (1H, s), 7.71 (1H, s), 6.77 (1H, s), 6.00–5.94 (1H, m), 5.35–5.27 (2H, m), 4.65–4.64 (3H, m), 4.33–4.31 (1H, m), 3.82–3.77 (5H, m), 3.68–3.66 (1H, m), 3.15–3.13 (1H, m), 1.89–1.86 (2H, m), 1.30–1.26 (3H, m), 1.14–1.10 (18H, m), 0.66–0.51 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 533 (M+H) +

[0484] 工程3：プロプ-2-エン-1-イル (11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキソ-8'- { [トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ} -11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボキシレート (7-3)

上記工程2にて得られた化合物(7-2) (6.68g, 12.5mmol)を、実施例10-1工程8と同様に反応させ、目的物(7-3) (6.44g, 97%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.20 (1H, s), 6.69 (1H, s), 5.89–5.78 (2H, m), 5.18–5.15 (2H, m)

, 4.62–4.60 (1H, m), 4.49–4.47 (1H, m), 3.85 (3H, s), 3.74–3.71 (1H, m), 3.59–3.57 (1H, m), 3.33–3.30 (2H, m), 2.43–2.40 (1H, m), 1.76–1.73 (1H, m), 1.28–1.20 (3H, m), 1.09–1.07 (18H, m), 0.74–0.65 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 531 (M+H) +

[0485] 工程4: プロプー2-エン-1-イル (11a' S)–11'–{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}–7'–メトキシ–5'–オキソ–8'–{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}–11', 11a'–ジヒドロ–1' H–スピロ[シクロプロパン–1, 2'–ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]–10' (5' H)–カルボキシレート (7–4)

上記工程3にて得られた化合物(7–3) (3.24 g, 6.10 mmol)を、実施例10–1工程9と同様に反応させ、目的物(7–4) (3.86 g, 98%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.20 (1H, s), 6.67 (1H, s), 6.01–5.98 (1H, m), 5.79–5.73 (1H, m), 5.14–5.10 (2H, m), 4.64–4.61 (1H, m), 4.37–4.34 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.72–3.69 (1H, m), 3.52–3.50 (1H, m), 3.29–3.26 (1H, m), 2.38–2.34 (1H, m), 1.55–1.51 (1H, m), 1.28–1.24 (3H, m), 1.15–1.07 (18H, m), 0.81–0.66 (13H, m), 0.21 (3H, s), 0.18 (3H, s). MS (APCI, ESI) m/z : 645 (M+H) +

[0486] 工程5: プロプー2-エン-1-イル (11a' S)–11'–{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}–8'–ヒドロキシ–7'–メトキシ–5'–オキソ–11', 11a'–ジヒドロ–1' H–スピロ[

シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-カルボキシレート (7-5)

上記工程4にて得られた化合物 (7-4) (4.49 g, 6.96 mmol) を、実施例10-1工程10と同様に反応させ、目的物 (7-5) (3.24 g, 95%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.25 (1H, s), 6.73 (1H, s), 6.02-6.00 (1H, m), 5.91 (1H, s), 5.77-5.75 (1H, m), 5.11-5.09 (2H, m), 4.64-4.62 (1H, m), 4.41-4.40 (1H, m), 3.95 (3H, s), 3.72-3.70 (1H, m), 3.54-3.53 (1H, m), 3.29-3.26 (1H, m), 2.36-2.34 (1H, m), 1.56-1.54 (1H, m), 0.79-0.67 (13H, m), 0.21 (3H, s), 0.20 (3H, s).

MS (APCI、ESI) m/z: 489 (M+H) +

[0487] 工程6: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S)-11' - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7' -メトキシ-8' - { [5- ({ (11a S)-7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-10- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-カルボキシレート (7-6)

上記工程5にて得られた化合物 (7-5) (0.080 g, 0.164 mmol) と実施例10-3工程9にて得られた化合物 (3-10) (0.095 g, 0.163 mmol) を、実施例10-3工程10と同様に反応させ、目的物 (7-6) (0.160 g, 98%) を得た。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 7.44-7.42 (3H, m), 7

. 12-7. 10 (2H, m), 7. 05-7. 03 (1H, m), 6. 92-6. 90 (2H, m), 6. 61-6. 59 (1H, m), 5. 87-5. 81 (3H, m), 5. 10-5. 07 (4H, m), 4. 66-4. 55 (3H, m), 4. 43-4. 39 (2H, m), 4. 21-3. 94 (5H, m), 3. 83 (3H, s), 3. 81 (3H, s), 3. 76 (3H, s), 3. 65-3. 62 (1H, m), 3. 56-3. 54 (1H, m), 3. 42-3. 39 (1H, m), 3. 22-3. 14 (2H, m), 2. 77-2. 73 (1H, m), 2. 42-2. 33 (1H, m), 1. 81-1. 79 (4H, m), 1. 55-1. 44 (3H, m), 0. 82 (9H, s), 0. 72-0. 53 (4H, m), 0. 19 (3H, s), 0. 17 (3H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 993 (M+H) +

[0488] 工程7: プロブ-2-エン-1-イル (11a' S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-{ [5- ({ (11a S)-7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル)-5-オキソ-10- [(プロブ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル]-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-カルボキシレート (7-7)

上記工程6にて得られた化合物 (7-6) (160mg, 0.161mmol) を、実施例10-3工程11と同様に反応させ、目的物 (7-7) (141mg, 定量的) を得た。

¹H-NMR (DMSO-D₆) δ : 7. 44-7. 42 (3H, m), 7. 08-7. 06 (3H, m), 6. 92-6. 90 (2H, m), 6. 82-6. 79 (1H, m), 6. 56-6. 54 (1H, m), 5. 77-5. 74 (3H, m), 5. 09 (4H, s), 4. 58-4. 55 (3H, m), 4. 43-4. 41 (2H, m), 4. 16-4. 01 (5H, m)

), 3.81–3.81 (6H, m), 3.76 (3H, s), 3.64 (1H, s), 3.56–3.53 (1H, m), 3.42–3.38 (1H, m), 3.25–3.13 (2H, m), 2.74–2.70 (1H, m), 2.37–2.34 (1H, m), 1.82–1.79 (4H, m), 1.59–1.56 (3H, m), 0.66–0.62 (4H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 879 (M+H) +

[0489] 工程8: (11a' S)–7'–メトキシ–8'–[(5–{[(11a S)–7–メトキシ–2–(4–メトキシフェニル)–5–オキソ–5, 10, 11, 11a–テトラヒドロ–1H–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン–8–イル]オキシ}ペンチル)オキシ]–1', 11a'–ジヒドロ–5' H–スピロ[シクロプロパン–1, 2'–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン]–5'–オン (7–8)

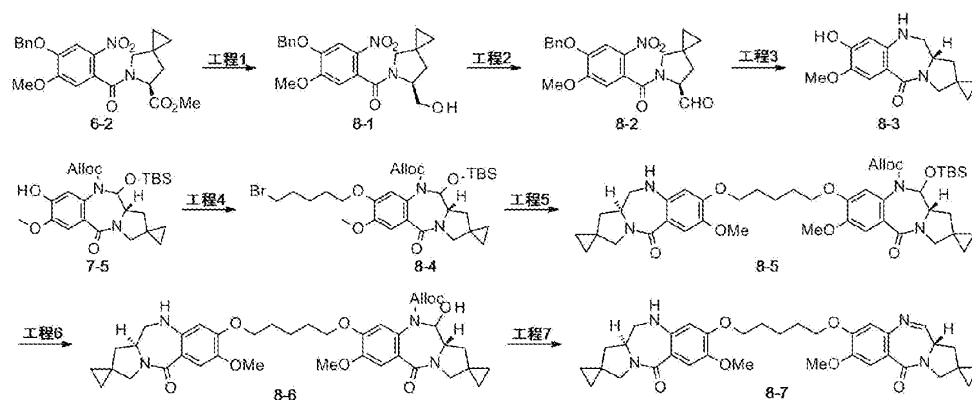
上記工程7にて得られた化合物(7–7)(141mg, 0.161mmol)を、実施例10–3工程12と同様に反応させ、目的物(7–8)(109.8mg, 99%)を得た。

¹H–NMR (DMSO–D₆) δ : 7.92–7.91 (1H, m), 7.45 (1H, s), 7.39–7.37 (2H, m), 7.33 (1H, s), 7.29 (1H, s), 6.92–6.89 (2H, m), 6.85 (1H, s), 6.56–6.54 (1H, m), 6.31 (1H, s), 4.19–4.12 (2H, m), 4.05–3.99 (1H, m), 3.95–3.93 (2H, m), 3.82–3.79 (4H, m), 3.76 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.52–3.46 (3H, m), 3.30–3.21 (2H, m), 2.78–2.74 (1H, m), 2.45–2.42 (1H, m), 2.06–2.05 (1H, m), 1.89–1.82 (4H, m), 1.60–1.58 (2H, m), 0.80–0.63 (4H, m).

MS (APCI、ESI) m/z : 693 (M+H) +

[実施例10–8: 薬物2]

[0490] [化60]



[0491] 工程1：[4-(ベンジル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル] [(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]メタノン(8-1)

実施例6工程1にて得られた化合物(6-2)(6.49g, 14.7mmol)のテトラヒドロフラン(147mL)溶液に、水素化ホウ素リチウム(0.642g, 29.5mmol)を0℃で加え、室温で2時間撹拌した。反応溶液に1規定塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた粗生成物(8-1)(6.94g, 定量的)を次工程で使用した。

MS(APCI、ESI) m/z: 413 (M+H)⁺

[0492] 工程2：(6S)-5-[4-(ベンジロキシ)-5-メトキシ-2-ニトロベンゾイル]-5-アザスピロ[2.4]ヘプタン-6-カルバルデヒド(8-2)

上記工程1にて得られた化合物(8-1)(4.50g, 11.0mmol)を、実施例10-1工程8と同様に反応させ、目的物(8-2)(1.94g, 43%)を得た。

MS(APCI、ESI) m/z: 411 (M+H)⁺

[0493] 工程3：(11a'S)-8'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-1', 10', 11', 11a'-テトラヒドロ-5'H-スピロ[シクロプロパン

－1, 2'－ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]－5'－オン(8-3)

上記工程2にて得られた化合物(8-2)(1.94g, 4.73mmol)のテトラヒドロフラン(25mL)、酢酸エチル(25mL)、メタノール(25mL)の混合溶液に、窒素雰囲気下、5%パラジウム炭素(54%水分、1.0g)を加えた後、反応溶液を水素雰囲気下、室温にて22時間攪拌した。反応溶液をセライト濾過した後、濾液を減圧留去した。得られた残渣を、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＝80：20(v/v)～0：100(v/v)]にて精製し、目的物(8-3)(1.20g, 93%)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.55(1H, s), 6.16(1H, s), 5.86(1H, s), 4.08-4.02(2H, m), 3.86(3H, s), 3.72-3.69(1H, m), 3.57-3.37(3H, m), 2.04-2.01(1H, m), 1.78-1.75(1H, m), 0.79-0.53(4H, m).

MS(APCI、ESI) m/z: 275 (M+H) +

[0494] 工程4：プロプ-2-エン-1-イル (11a'S)-8'-[(5-ブromoペンチルオ)オキシ]-11'-{tert-ブチル(ジメチル)シリル}オキシ}-7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-カルボキシレート(8-4)

実施例10-7工程5にて得られた化合物(7-5)(0.300g, 0.614mmol)を、実施例10-3工程2と同様に反応させ、目的物(8-4)(0.388g, 99%)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.24(1H, s), 6.60(1H, s), 6.02-5.98(1H, m), 5.80-5.75(1H, m), 5.11-5.06(2H, m), 4.68-4.64(1H, m), 4

. 40–4. 38 (1H, m), 4. 02–3. 98 (2H, m), 3. 92 (3H, s), 3. 72–3. 69 (1H, m), 3. 54–3. 52 (1H, m), 3. 46–3. 41 (2H, m), 3. 29–3. 26 (1H, m), 2. 38–2. 34 (1H, m), 1. 94–1. 87 (4H, m), 1. 65–1. 62 (2H, m), 1. 55–1. 55 (1H, m), 0. 86 (9H, s), 0. 75–0. 67 (4H, m), 0. 24–0. 22 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 639 [81Br, (M+H)⁺], 637 [79Br, (M+H)⁺].

[0495] 工程5: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S)–11'–{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}–7'–メトキシ–8'–[(5–{[(11a' S)–7'–メトキシ–5'–オキソ–5', 10', 11', 11a'–テトラヒドロ–1' H–スピロ[シクロプロパン–1, 2'–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン]–8'–イル]オキシ}ペンチル)オキシ]–5'–オキソ–11', 11a'–ジヒドロ–1' H–スピロ[シクロプロパン–1, 2'–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン]–10' (5' H)–カルボキシレート (8–5)

上記工程4にて得られた化合物(8–4) (0. 203g 0. 318mmol)と上記工程3にて得られた化合物(8–3) (0. 131g, 0. 478mmol)を、実施例10–3工程10と同様に反応させ、目的物(8–5) (0. 0880g, 33%)を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 831 (M+H)⁺

[0496] 工程6: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S)–11'–ヒドロキシ–7'–メトキシ–8'–[(5–{[(11a' S)–7'–メトキシ–5'–オキソ–5', 10', 11', 11a'–テトラヒドロ–1' H–スピロ[シクロプロパン–1, 2'–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン]–8'–イル]オキシ}ペンチル)オキシ]–5'–オ

キソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボキシレート (8-6)

上記工程5にて得られた化合物 (8-5) (0.0880 g, 0.106 mmol) を、実施例10-3工程11と同様に反応させ、目的物 (8-6) (0.0500 g, 66%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 717 (M+H) +

[0497] 工程7 : (11a' S) -7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -1', 10', 11', 11a'-テトラヒドロ-5' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -5' -オン (8-7)

上記工程6にて得られた化合物 (8-6) (0.0500 g, 0.0698 mmol) を実施例10-3工程12と同様に反応させ、目的物 (8-7) (0.0330 g, 77%) を得た。

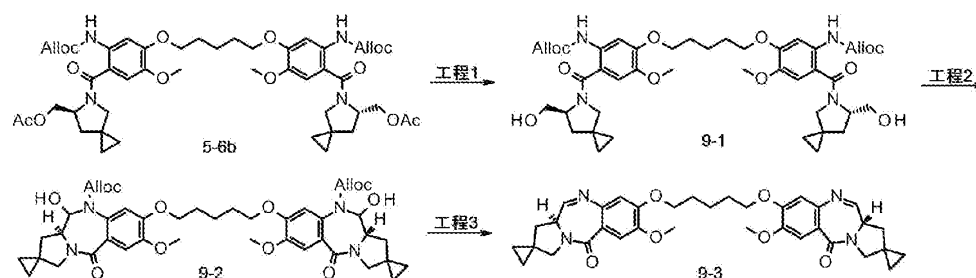
¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.80 (1H, m), 7.58 (1H, s), 7.52 (1H, s), 6.81 (1H, s), 6.05 (1H, s), 4.17-3.97 (5H, m), 3.94 (3H, s), 3.87 (1H, m), 3.84 (3H, s), 3.72-3.68 (3H, m), 3.51-3.45 (5H, m), 2.54-2.51 (1H, m), 2.03-1.90 (6H, m), 1.75-1.68 (2H, m), 0.66 (8H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 615 (M+H) +

[実施例10-9 : 薬物3]

[0498]

[化61]



[0499] 工程1：ジ-2-プロペン-1-イル {1, 5-ペンタンジイルビス [オキシ (6- { [(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ [2, 4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシベンゼン-3, 1-ジイル)]}ビスカルバメート (9-1)

実施例10-5工程5にて得られたビスアリルオキシカルボニル体 (5-6b) (0.460g, 0.508mmol) を実施例10-5工程7と同様に反応させ、目的物 (9-1) (0.421g, 定量的) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 9.19 (2H, s), 7.22 (2H, s), 6.89 (2H, s), 5.97-5.92 (2H, m), 5.33 (2H, m), 5.22 (2H, m), 4.81 (2H, m), 4.55 (4H, m), 4.26 (2H, s), 3.96 (4H, m), 3.74 (6H, s), 3.62 (2H, m), 3.56 (2H, s), 3.37 (2H, m), 3.11 (2H, m), 1.88-1.78 (8H, m), 1.56-1.54 (2H, m), 0.54-0.43 (8H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 821 (M+H) $^+$.

[0500] 工程2：ジプロプ-2-エン-1-イル (11a'S, 11a'') (S)-8', 8''-[ペンタン-1, 5-ジイルビス (オキシ)]ビス (11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボキシレート

) (9-2)

上記工程1にて得られた化合物(9-1)(0.421g, 0.513mmol)を、実施例10-5工程8と同様に反応させ、目的物(9-2)(0.326g, 78%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 7.07 (2H, s), 6.80 (2H, s), 6.55 (2H, m), 5.84-5.81 (2H, m), 5.75 (2H, m), 5.09-5.05 (4H, m), 4.62 (2H, m), 4.40 (2H, m), 3.98 (4H, m), 3.81 (6H, s), 3.54 (2H, m), 3.43-3.37 (2H, m), 3.14 (2H, m), 2.35 (2H, m), 1.81-1.79 (4H, m), 1.59-1.56 (4H, m), 0.70-0.59 (8H, m). MS (APCI, ESI) m/z : 817 (M+H) +.

[0501] 工程3: (11a' S, 11a' ' ' ' S) -8', 8' ' - [1, 5-ペンタンジイルビス(オキシ)] ビス(7'-メトキシ-1', 11a'-ジヒドロ-5' H-スプロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -5'-オン) (9-3)

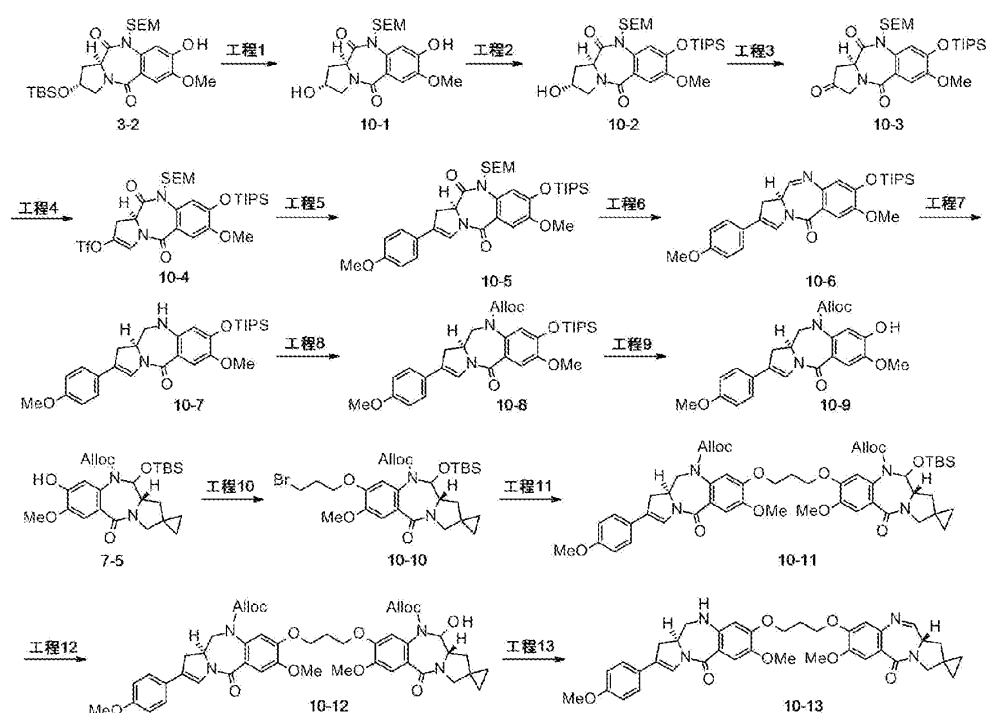
上記工程2にて得られた化合物(9-2)(0.326g, 0.399mmol)を、実施例10-3工程12と同様に反応させ、目的物(9-3)(0.208g, 85%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 7.91 (2H, m), 7.32 (2H, s), 6.84 (2H, s), 4.11 (2H, m), 4.06 (2H, m), 3.82 (6H, s), 3.51-3.31 (6H, m), 2.43 (2H, m), 2.05 (2H, m), 1.82-1.80 (4H, m), 1.60-1.58 (2H, m), 0.79-0.77 (2H, m), 0.68-0.64 (6H, m). MS (APCI, ESI) m/z : 613 (M+H) +.

[実施例10-10: 薬物4]

[0502]

[化62]



[0503] 工程1：(2R, 11aS)-2, 8-ジヒドロキシ-7-メトキシ-10-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}-2, 3-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-5, 11(10H, 11aH)-ジオン(10-1)

実施例10-3工程1で得られた化合物(3-2)(5.00g, 9.66mmol)を実施例10-3工程3と同様に反応させ目的物(10-1)(3.95g, 100%)を得た。MS(APCI, ESI) m/z : 409 (M+H)⁺

[0504] 工程2：(2R, 11aS)-2-ヒドロキシ-7-メトキシ-10-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}-8-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}-2, 3-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-5, 11(10H, 11aH)-ジオン(10-2)

上記工程1で得られた化合物(10-1)(3.95g, 9.67mmol)

）のジクロロメタン（97 mL）溶液に、イミダゾール（1.65 g, 24.2 mmol）、トリイソプロピルシリルクロリド（2.46 mL, 11.6 mmol）とジメチルホルムアミド（5 mL）を加え、室温で21時間攪拌した。反応溶液に水を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を水で洗浄し、減圧留去した。得られた残渣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）～20：80（v/v）〕にて精製し、目的物（10-2）（4.78 g, 87%）を得た。

MS（APCI, ESI） m/z ：565（M+H）+

[0505] 工程3：（11aS）-7-メトキシ-10-〔〔2-（トリメチルシリル）エトキシ〕メチル〕-8-〔〔トリ（プロパン-2-イル）シリル〕オキシ〕-1H-ピロロ〔2, 1-c〕〔1, 4〕ベンゾジアゼピン-2, 5, 11（3H, 10H, 11aH）-トリオン

上記工程2にて得られた化合物（10-2）（4.78 g, 8.43 mmol）を、実施例10-3工程4と同様に反応させ、目的物（10-3）（2.36 g, 50%）を得た。MS（APCI, ESI） m/z ：563（M+H）+

[0506] 工程4：（11aS）-7-メトキシ-5, 11-ジオキソ-10-〔〔2-（トリメチルシリル）エトキシ〕メチル〕-8-〔〔トリ（プロパン-2-イル）シリル〕オキシ〕-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ〔2, 1-c〕〔1, 4〕ベンゾジアゼピン-2-イル トリフルオロメタンスルフォネート（10-4）

上記工程3にて得られた化合物（10-3）（1.53 g, 2.72 mmol）を実施例10-3工程5と同様に反応させ、目的化合物（10-4）（1.27 g, 69%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ （CDCl₃） δ ：7.31（2H, s）, 7.15（1H, m）, 5.52（1H, m）, 4.65（1H, m）, 4.57（1H, m）, 3.95-3.89（1H, m）, 3.87（3H, s）, 3.75-3.58（2H, m）, 3.18-3.14（1H, m）, 1.33-1.

2.5 (3H, m), 1.10 (18H, m), 1.00–0.96 (2H, m), 0.03 (9H, s).

[0507] 工程5: (11a S)–7–メトキシ–2–(4–メトキシフェニル)–10–{[2–(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}–8–{[トリ(プロパン–2–イル)シリル]オキシ}–1H–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン–5, 11 (10H, 11aH)–ジオン (10–5)

上記工程4で得られた化合物(10–4) (0.519 g, 0.747 mmol)を、実施例10–3工程6と同様に反応させ、目的化合物(10–5) (0.511 g, 定量的)を得た。

¹H–NMR (CDCl₃) δ: 7.41–7.31 (5H, m), 6.91–6.85 (2H, m), 5.52 (1H, m), 4.64 (1H, m), 4.57 (1H, m), 3.97–3.90 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.75–3.56 (2H, m), 3.19–3.09 (1H, m), 1.36–1.23 (3H, m), 1.11 (18H, m), 1.02–0.97 (2H, m), 0.03 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z: 653 [(M+H)+]

[0508] 工程6: (11a S)–7–メトキシ–2–(4–メトキシフェニル)–8–{[トリ(プロパン–2–イル)シリル]オキシ}–1, 11a–ジヒドロ–5H–ピロロ[2, 1–c][1, 4]ベンゾジアゼピン–5–オン (10–6)

上記工程5で得られた化合物(10–5) (0.178 g, 0.272 mmol)を、実施例10–3工程7と同様に反応させ、目的化合物(10–6) (0.094 g, 68%)を得た。

¹H–NMR (CDCl₃) δ: 7.87 (1H, m), 7.51 (1H, s), 7.41–7.39 (1H, m), 7.36–7.33 (2H, m), 6.93–6.89 (2H, m), 6.86 (1H, s), 4.44–4

. 38 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.61–3.53 (1H, m), 3.41–3.34 (1H, m), 1.33–1.25 (3H, m), 1.11–1.06 (18H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 507 [(M+H)+]

[0509] 工程7: (11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-8-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}-1,10,11,11a-テトラヒドロ-5H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-5-オン (10-7)

上記工程6で得られた化合物(10-6)(0.063g, 0.124mmol)を用いて、実施例10-3工程8と同様に反応させ、目的化合物(10-7)(0.046g, 72%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.53–7.48 (2H, m), 7.33–7.29 (2H, m), 6.90–6.86 (2H, m), 6.13–6.11 (1H, m), 4.36–4.29 (1H, m), 4.11 (1H, s), 3.82 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.59–3.50 (2H, m), 3.40–3.31 (1H, m), 2.78–2.68 (1H, m), 1.31–1.20 (3H, m), 1.13–1.02 (18H, m). MS (APCI, ESI) m/z : 509 [(M+H)+]

[0510] 工程8: プロパン-2-エン-1-イル (11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-8-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}-11,11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-10(5H)-カルボキシレート (10-8)

上記工程7で得られた化合物(10-7)(0.046g, 0.090mmol)を用いて、実施例10-3工程9と同様に反応させ、目的化合物(10-8)(0.03g, 56%)を得た。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.39–7.36 (1H, m), 7.31–7.28 (2H, m), 7.22 (1H, s), 6.90–6.86 (3H, m), 6.75–6.7

2 (1H, m), 5.82–5.69 (1H, m), 5.18–5.08 (2H, m), 4.59–4.52 (1H, m), 4.48–4.39 (1H, m), 4.39–4.29 (1H, m), 4.23–4.12 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.64–3.58 (1H, m), 3.32–3.25 (1H, m), 2.73–2.65 (1H, m), 1.30–1.20 (2H, m), 1.12–1.06 (18H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 593 [(M+H)+]

[0511] 工程9: プロプ-2-エン-1-イル (11a S) -8-ヒドロキシ-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-11, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-10 (5H)-カルボキシレート (10-9)

上記工程8で得られた化合物(10-8) (0.030g, 0.050mmol)を、実施例10-1工程10と同様に反応させ、目的化合物(10-9) (0.015g, 0.034mmol)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.39–7.25 (4H, m), 6.92–6.78 (3H, m), 6.03–5.92 (1H, m), 5.86–5.68 (1H, m), 5.20–5.07 (2H, m), 4.66–4.57 (1H, m), 4.52–4.40 (1H, m), 4.40–4.27 (1H, m), 4.27–4.16 (1H, m), 3.95 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.66–3.59 (1H, m), 3.32–3.21 (1H, m), 2.74–2.64 (1H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 437 [(M+H)+]

[0512] 工程10: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S) -8'-(3-ブロモプロポキシ)-11'-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボキシレート (10-1

0)

実施例7工程5で得られた化合物(7-5)(0.131g, 0.268 mmol)を実施例10-4工程1と同様に反応させ、目的物(10-10)(0.086g, 52%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 7.24 (1H, s), 6.65 (1H, s), 6.02 (1H, m), 5.87-5.71 (1H, m), 5.15-5.04 (2H, m), 4.72-4.62 (1H, m), 4.44-4.32 (1H, m), 4.23-4.07 (3H, m), 3.92 (3H, s), 3.77-3.47 (4H, m), 3.28 (1H, m), 2.37 (3H, m), 1.57-1.52 (1H, m), 0.86 (9H, s), 0.82-0.57 (4H, m), 0.21 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 611 [81Br, (M+H)⁺], 609 [79Br, (M+H)⁺]

[0513] 工程11: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S)-11'-{ [tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7'-メトキシ-8'-[3-({(11a S)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-10-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ)プロポキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボキシレート (10-11)

上記工程10で得られる化合物(10-10)(0.015g, 0.034 mmol)と、上記工程9で得られる化合物(10-9)(0.030g, 0.048 mmol)を用いて、実施例10-3工程10と同様に反応させ、目的化合物(10-11)(0.032g, 96%)を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 965 [(M+H)⁺]

[0514] 工程12: プロプ-2-エン-1-イル (11a' S)-11'-ヒド

ロキシ-7'-メトキシ-8'-[3-({(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-10-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ)プロポキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'H)-カルボキシレート (10-12)

上記工程11で得られた化合物(10-11)(0.031g, 0.032mmol)を実施例10-3工程11と同様に反応させ、目的物(10-12)(0.026g, 95%)を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 851 [(M+H)+]

[0515] 工程13: (11a'S)-7'-メトキシ-8'-[3-{[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ]プロポキシ}-1', 11a'-ジヒドロ-5'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-5'-オン (10-13)

上記工程12で得られた化合物(10-12)(0.026g, 0.030mmol)を実施例10-3工程12と同様に反応させ、目的物(10-13)(0.018g, 88%)を得た。

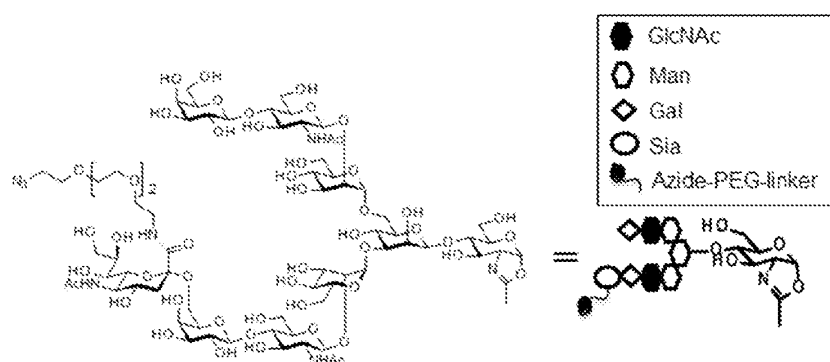
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.80 (1H, m), 7.54-7.51 (3H, m), 7.33-7.29 (2H, m), 6.91-6.85 (3H, m), 6.14 (1H, s), 4.35-4.17 (6H, m), 3.95 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.76-3.25 (5H, m), 2.79-2.69 (1H, m), 2.52 (1H, m), 2.45-2.35 (1H, m), 2.03-1.96 (1H, m), 1.28-1.23 (2H, m), 0.78-0.69 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 665 $[(M+H)^+]$

[実施例 11: $[N_3-PEG(3)]-MSG1-Ox$]

$[N_3-PEG(3)]-MSG1$ 合成

[0516] [化63]



[0517] (上記の図において、構造式の右の模式図は、実施例 12, 13, 14, 15 の反応式に表示される中間体の模式図中の対応構造を示す。)

工程 1: (MSG1-) Asn

市販品である monosialo-Asn free (1S2G/1G2S-10NC-Asn、(株)糖鎖工学研究所製) (「(MSG-) Asn」と呼ぶ) (500mg) を以下の条件で逆相 HPLC 分離精製し、1st main peak として溶出される (MSG1-) Asn (保持時間 15~19 min 付近) と 2nd main peak として溶出される (MSG2-) Asn (保持時間 21~26 min 付近) に分離した。0.1% ぎ酸水溶液を溶離液として使用し、装置には ELS-PDA トリガー分取システム (日本分光株式会社製) を使用し、カラムには Inertsil ODS-3 (10 μ m、30 Φ ×250mm、GLサイエンス社製) を使用し、流速を 30mL/min とした。溶出中に UV 検出 (210nm) された最初のピークに帰属するフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、目的物 (238mg) を得た。

[0518] 工程 2: MSG1

上記工程 1 で得られた化合物 (229mg) を 200mM リン酸緩衝溶液

(pH 6.25) (1145 μ L) に溶解させ、EndoM (東京化成工業 (株) 製、1 U/mL) の水溶液 (100 μ L) を加え、35°C で6日間インキュベートした。反応終了後、反応液をVIVASPIN 15R (Hydrosart膜、30K, 6,000 $\times$ G) を用いて限外ろ過し、得られた通過液を逆相HPLC分離精製した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を溶離液として使用し、装置にはELS-PDA トリガー分取システム (日本分光株式会社製)、カラムにはInertsil ODS-3 (GLサイエンス社製) を使用した。溶出中にUV検出 (210 nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥し、目的物 (117 mg) を得た。

[0519] 工程3: [N₃-PEG (3)]-MSG1

5 mL サンプリグチューブ ((株) イナ・オプティカ) に、11-アジド-3,6,9-トリオキサウンデカン-1-アミン (0.108 mL, 0.541 mmol) と上記工程2で得られたMSG1 (117 mg, 0.068 mmol) の水溶液 (1.2 mL) を加え、1時間攪拌した後に、凍結乾燥した。凍結乾燥後の5 mL サンプリグチューブに、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (103 mg, 0.27 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (1.2 mL) とジイソプロピルエチルアミン (0.046 mL, 0.27 mmol) を加え、37°C で3時間攪拌した。反応終了後、あらかじめジエチルエーテル (20 mL) を加えた遠沈管 (50 mL) に反応液を移した。小型遠心機 (日立工機、CF16RX) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。さらにジエチルエーテル (10 mL) を加えて、遠心分離操作後、デカンテーションを行った。続いて、アセトニトリル (10 mL) を加え、遠心分離後、デカンテーションする操作を二回繰り返した後、減圧下乾燥し、粗生成物を得た。得られた固形物を上記工程2と同様の条件にて逆相HPLC精製を行い、目的物 (94.2 mg) を得た。

[0524] (上記式は、MSG1型N297糖鎖の非還元末端シアル酸にアジド基が導入されたリンカー構造を示す。実施例12において、N297糖鎖にアジド基を導入した中間体のリンカー構造は上記式と同一の構造である。)

工程1: (Fuc α 1,6)GlcNAc-HO1L02抗体の調製

HO1L02抗体溶液ca. 21.1mg/mL (50mMリン酸緩衝液 (pH6.0)) (4.07mL) に、7.7mg/mL野生型EndoS溶液 (PBS) を0.233mL加え、37℃で4時間インキュベートした。反応の進行具合をExperion電気泳動ステーション (BIO-RAD製) を用いて確認した。反応終了後、以下の方法に従い、アフィニティークロマトグラフィーによる精製とハイドロキシアパタイトカラムによる精製を行った。

[0525] (1) アフィニティークロマトグラフィーによる精製

精製装置: AKTA avant (GEヘルスケア製)

カラム: HiTrap rProtein A FF (5mL) (GEヘルスケア製)

流速: 5mL/min (チャージ時は1.25mL/min)

上記で得た反応液を複数回に分けて精製した。カラムへの結合時は、反応液をカラム上部へ添加し、結合バッファー (20mMリン酸緩衝液 (pH6.0)) を1.25mL/minで4CV (Column Volume) 流し、更に5mL/minで5CV流した。中間洗浄時は、洗浄溶液 (20mMリン酸緩衝液 (pH7.0)、0.5M塩化ナトリウム溶液) を15CV流した。溶出時は、溶出バッファー (ImmunoPure IgG Eution buffer、PIERCE製) を6CV流した。溶出液を1Mトリス緩衝液 (pH9.0) で直ちに中和した。目的物を含むフラクションを共通操作Cを用いて、5mMリン酸緩衝液50mM2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 溶液 (pH6.8) への緩衝液交換を行った。

[0526] (2) ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製

精製装置：AKTA avant (GE ヘルスケア製)

カラム：Bio-Scale Mini CHT Type I カートリッジ (5 mL) (BIO-RAD製)

流速：5 mL/min (チャージ時は1.25 mL/min)

上記(1)で得られた溶液をカラムの上部へ添加し、A液(5 mM リン酸緩衝液、50 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)溶液(pH 6.8))を1.25 mL/minで4 CV流し、更に5 mL/minで3 CV流した。その後、A液とB液(5 mM リン酸緩衝液50 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)溶液(pH 6.8)、2 M 塩化ナトリウム溶液)を用いて、溶出した。溶出条件は、A液：B液=100：0～0：100(15 CV)である。さらに、洗浄溶液(500 mM リン酸緩衝液(pH 6.5))を5 CV流した。

[0527] 目的物を含むフラクションを共通操作Cを用いて緩衝液交換を行い、11.4 mg/mLの(Fuc α 1,6)GlcNAc-HO1L02抗体溶液(50 mM リン酸緩衝液(pH 6.0))(5.00 mL)を得た。

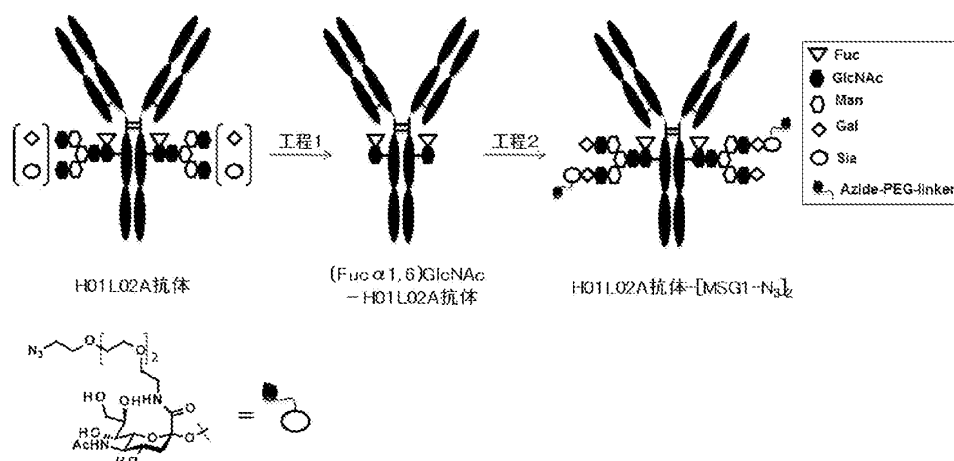
[0528] 工程2：HO1L02抗体-[MSG1-N₃]₂の調製

上記工程1にて得られた11.4 mg/mL (Fuc α 1,6)GlcNAc-HO1L02抗体溶液(50 mM リン酸緩衝液(pH 6.0))(5.00 mL)に、実施例11工程4で合成した糖鎖(9.00 mg)の50 mM リン酸緩衝液(pH 6.0)溶液(0.180 mL)、5.10 mg/mLのEndoS D233Q/Q303L溶液(PBS)(0.230 mL)を加えて、30℃で3時間インキュベートした。反応の進行具合をExperion電気泳動ステーション(BIO-RAD製)を用いて確認した。反応終了後、上記工程1と同様にアフィニティークロマトグラフィーによる精製とハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製を行った後、目的物を含むフラクションを共通操作Cを用いてリン酸緩衝生理食塩水(pH 6.0)へ緩衝液交換を行い、9.91 mg/mLのHO1L02抗体[MSG1-N₃]₂溶液(リン酸緩衝生理食塩水(pH 6.0))(4.

00 mL) を得た。

[0529] [実施例 13 : H01L02A 抗体 - [MSG1-N₃]₂]

[0530] [化65]



[0531] 工程1 : (Fucα1, 6)GlcNAc-H01L02A 抗体の調製
H01L02A 抗体溶液 ca. 21.6 mg/mL (50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0)) (1.85 mL) を用いて、上記実施例 12 工程 1 と同様の操作を行い、14.6 mg/mL の (Fucα1, 6)GlcNAc-H01L02A 抗体溶液 (50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)) (2.0 mL) を得た。

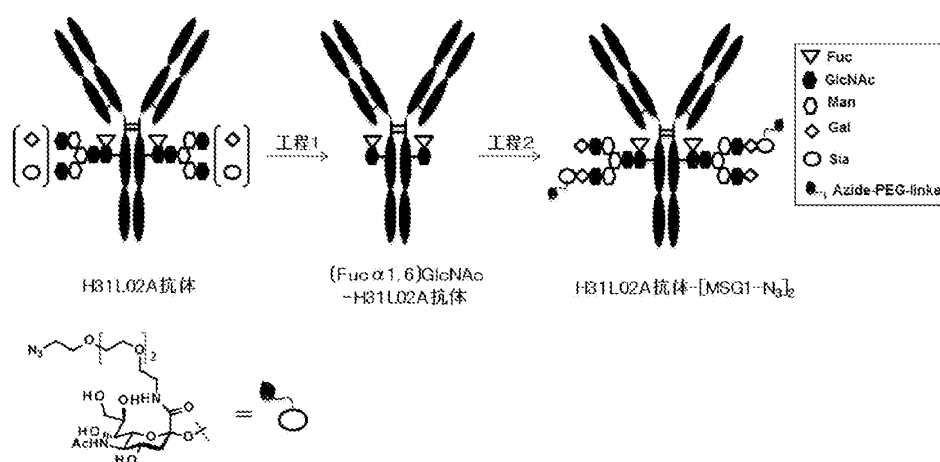
[0532] 工程2 : H01L02A 抗体 - [MSG1-N₃]₂ の調製

上記工程 1 で得られた 14.6 mg/mL (Fucα1, 6)GlcNAc-H01L02A 抗体溶液 (50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)) (2.0 mL) を用いて、実施例 12 工程 2 と同様の操作を行うことによって、10.0 mg/mL の H01L02A 抗体 - [MSG1-N₃]₂ 溶液 (酢酸緩衝液 (pH 5.5, 含ソルビトール)) (2.5 mL) を得た。

[0533] [実施例 14 : H31L02A 抗体 - [MSG1-N₃]₂]

[0534]

[化66]



[0535] 工程1：(Fuc α1, 6)GlcNAcH31L02A抗体調製の調製

H31L02A抗体溶液ca. 23.2mg/mL(50mリン酸緩衝溶液(pH6.0))(3.45mL)を用いて、上記実施例12工程1と同様の操作を行い、8.43mg/mLの(Fuc α1, 6)GlcNAc-H31L02A抗体溶液(50mMリン酸緩衝液(pH6.0))(6.1mL)を得た。

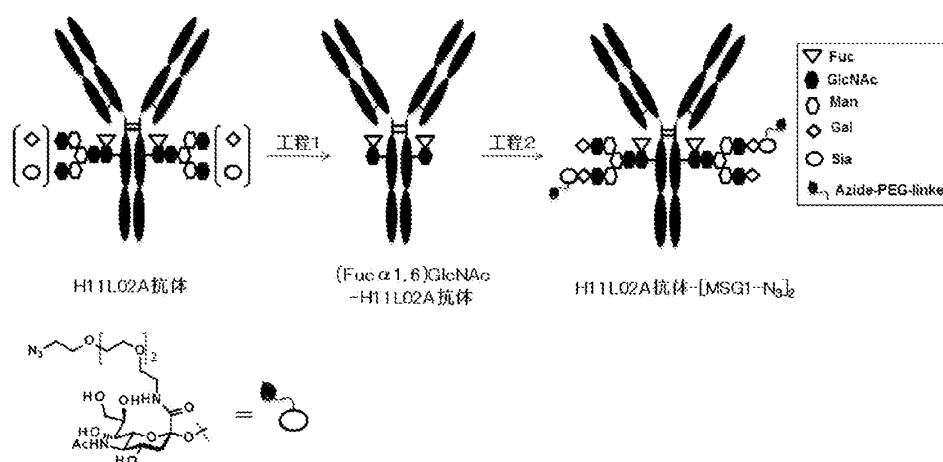
[0536] 工程2：H31L02A抗体-[MSG1-N₃]₂の調製

上記工程1で得られた8.43mg/mL(Fuc α1, 6)GlcNAc-H31L02A抗体溶液(50mMリン酸緩衝液(pH6.0))(5.00mL)を用いて、実施例12工程2と同様の操作を行うことによって、6.52mg/mLのH31L02A抗体-[MSG1-N₃]₂溶液(リン酸緩衝生理食塩水(pH6.0))(4.00mL)を得た。

[0537] [実施例15：H11L02A抗体-[MSG1-N₃]₂]

[0538]

[化67]



[0539] 工程1：(Fuc α 1, 6)GlcNAc-H11L02A抗体調製

H11L02A抗体溶液ca. 24.2mg/mL(50mリン酸緩衝溶液(pH6.0))(3.0mL)を用いて、上記実施例12工程1と同様の操作を行い、20.42mg/mLの(Fuc α 1, 6)GlcNAc-H11L02A抗体溶液(50mMリン酸緩衝液(pH6.0))(2.7mL)を得た。

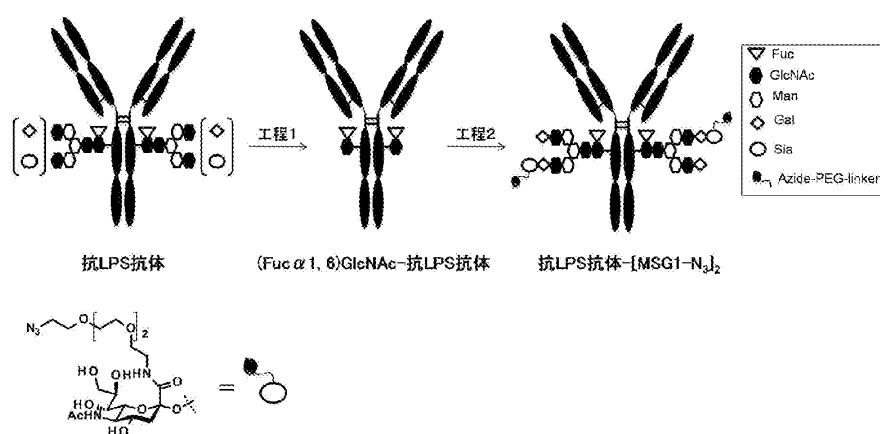
[0540] 工程2：H11L02A抗体-[MSG1-N₃]₂調製

上記工程1で得られた20.39mg/mL(Fuc α 1, 6)GlcNAc-H11L02A抗体溶液(50mMリン酸緩衝液(pH6.0))(1.55mL)を用いて、上記実施例12工程2と同様の操作を行うことによって、10.26mg/mLのH11L02A抗体-[MSG1-N₃]₂溶液(酢酸緩衝液(pH5.5, 含ソルビトール))(2.6mL)を得た。

[0541] [実施例16：抗LPS抗体-[MSG1-N₃]₂]

[0542]

[化68]



[0543] 工程1：(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗LPS抗体調製の調製

抗LPS抗体溶液ca. 17mg/mL(25mMヒスチジン溶液(pH 6.0)、5%ソルビトール溶液)(6.6mL)を用いて、実施例12工程1と同様の操作を行い、21.03mg/mLの(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗LPS抗体溶液(50mMリン酸緩衝液(pH 6.0))(5.4mL)を得た。

[0544] 工程2：抗LPS抗体-[MSG1-N₃]₂の調製

上記工程1で得られた21.03mg/mL(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗LPS抗体溶液(50mMリン酸緩衝液(pH 6.0))(5.4mL)を用いて、実施例12工程2と同様の操作を行うことによって、9.89mg/mLの抗LPS抗体-[MSG1-N₃]₂溶液(リン酸緩衝生理食塩水(pH 6.0))(7.9mL)を得た。

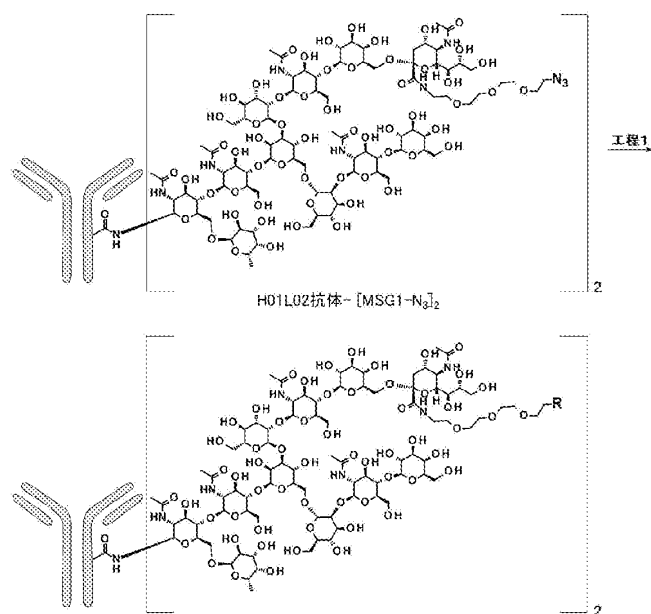
[0545] 実施例17～27は、ADCの合成を記載する。

[0546] [実施例17：ADC1]

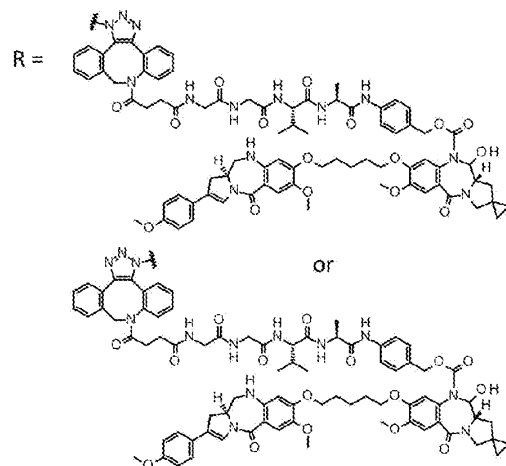
実施例17に記載のADCは、下記の反応式に示すように実施例12の工程2で得られた抗体と実施例10～3工程13で得られた薬物リンカー(3-14)をコンジュゲーションすることによって合成した。式中、Rは実施例で用いられた薬物リンカーを示す。

[0547]

[化69]



[0548] [化70]



[0549] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例17工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 12 工程 2 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) 溶液 (6.76 mg/mL, 1.50 mL) に、室温にて 1, 2-プロパンジオール (1.42 mL)、実施例 10-3 工程 13 にて得られた化合物 (3-14) の 10 mM ジメチルスルホキシド溶液 (0.0836 mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6.00 mL 得た。

[0550] 特性評価：共通操作 E, F を用いて下記の特性値を得た。

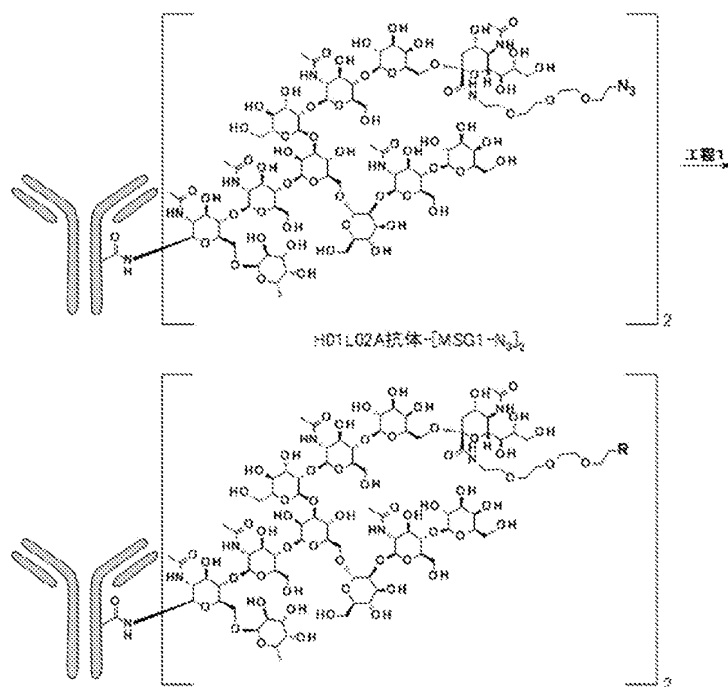
[0551] 抗体濃度：1.37 mg/mL, 抗体収量：8.23 mg (81%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n)：1.7

[実施例 18 ADC2]

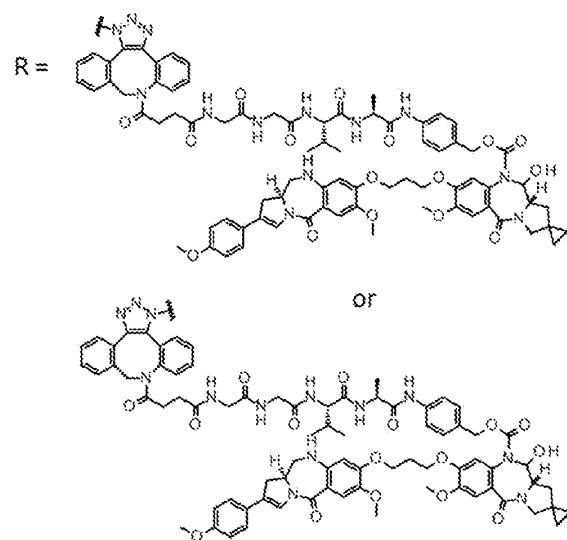
実施例 18 に記載の ADC は、下記の反応式に示すように実施例 13 工程 2 で得られた抗体と実施例 10-4 工程 12 で得られた薬物リンカー (4-12) をコンジュゲーションすることによって合成した。式中、R は実施例で用いられた薬物リンカーを示す。

[0552]

[化71]



[0553] [化72]



[0554] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例18工程1

で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例13工程2にて得られた抗体の10mM 酢酸緩衝液、5% ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (10.0mg/mL, 100μL) に、室温にて1, 2-プロパンジオール (25μL)、実施例10-4工程12にて得られた化合物 (4-12) の10mMジメチルスルホキシド溶液 (8μL; 抗体1分子に対して12当量) と1, 2-プロパンジオール (67μL) の混合溶液を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を1.2mL得た。

[0555] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

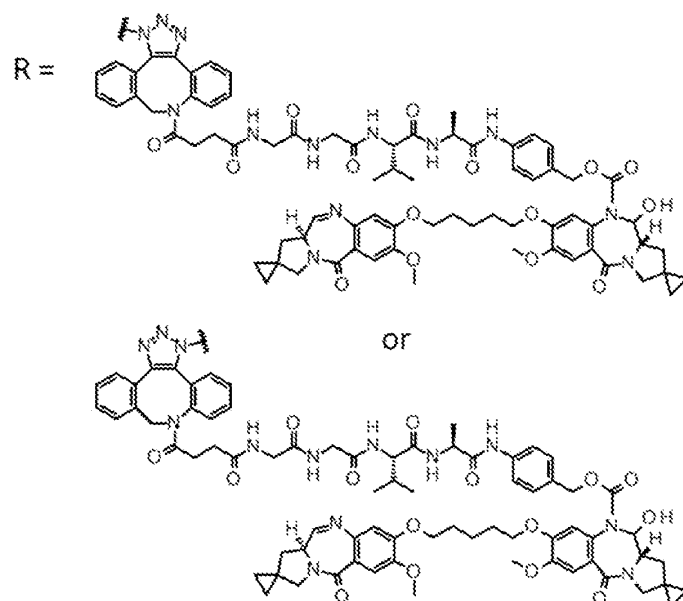
[0556] 抗体濃度：0.56mg/mL, 抗体収量：0.67mg (67%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n) : 1.9

[実施例19：ADC3]

実施例19に記載のADCは、実施例13工程2で得られた抗体と実施例10-5工程10で得られた薬物リンカー (5-11) をコンジュゲーションすることによって合成した。

[0557]

[化73]



[0558] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例19工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例13工程2にて得られた抗体の10 mM 酢酸緩衝液、5% ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (10.0 mg/mL, 100 μ L) に、室温にて1, 2-プロパンジオール (25 μ L)、実施例10-5工程10にて得られた化合物 (5-11) の10 mMジメチルスルホキシド溶液 (8 μ L; 抗体1分子に対して12当量) と1, 2-プロパンジオール (67 μ L) の混合溶液を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を1.2 mL得た。

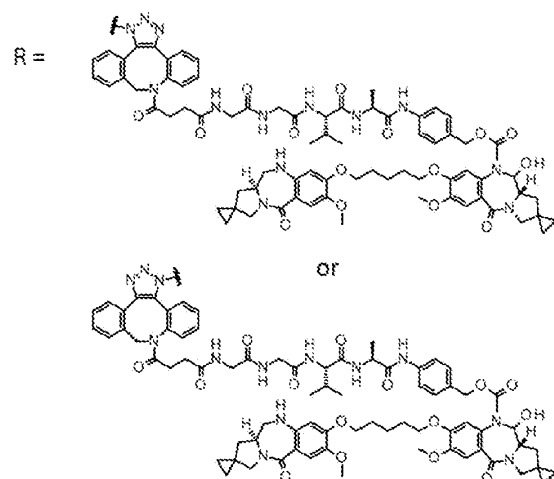
[0559] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

[0560] 抗体濃度：0.53 mg/mL, 抗体収量：0.64 mg (64%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n) : 1.9

[実施例 20 : ADC4]

実施例 20 に記載の ADC は、実施例 13 の工程 2 で得られた抗体と実施例 10-6 工程 12 で得られた薬物リンカー (6-13) をコンジュゲーションすることによって合成した。

[0561] [化74]



[0562] (工程 1 で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 20 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 13 工程 2 にて得られた抗体の 10 mM 酢酸緩衝液, 5% ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (10.0 mg/mL, 100 μ L) に、室温にて 1, 2-プロパンジオール (25 μ L)、実施例 10-6 工程 12 にて得られた化合物 (6-13) の 10 mM ジメチルスルホキシド溶液 (8 μ L ; 抗体 1 分子に対して 1.2 当量) と 1, 2-プロパンジオール (67 μ L) の混合溶液を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有す

る溶液を1.2 mL得た。

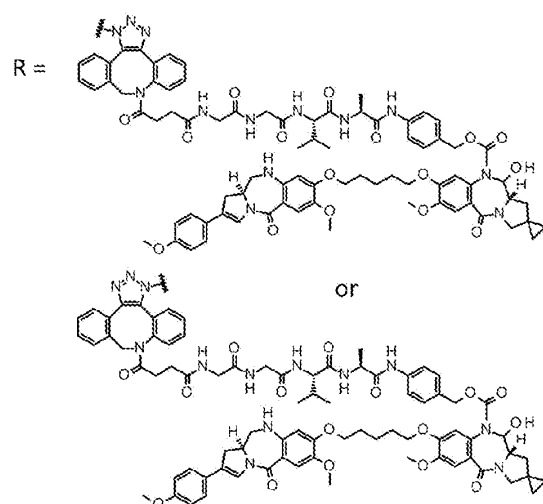
[0563] 特性評価：共通操作E，Fを用いて下記の特性値を得た。

[0564] 抗体濃度：0.56 mg/mL，抗体収量：0.67 mg（67％），抗体一分子あたりの平均薬物結合数（n）：1.9

〔実施例21：ADC5〕

実施例21に記載のADCは、実施例13工程2で得られた抗体と実施例10-3工程13で得られた薬物リンカー（3-14）をコンジュゲーションすることによって合成した。

[0565] [化75]



[0566] （工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例21工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。）

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例13工程2にて得られた抗体の10 mM 酢酸緩衝液，5％ ソルビトール（pH 5.5）溶液（10.0 mg/mL，1.70 mL）に、室温にて1，2-プロパンジオール（0.850 mL）、実施例10-3工程13にて得られた化合物（3-14）の10 mMジメチルスルホキシド溶液（0.141 mL；抗体1分子に対して12当量）と1，2-プロパンジオ

ール（0.710 mL）の混合溶液を加え、チューブローテーター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を10.5 mL得た。

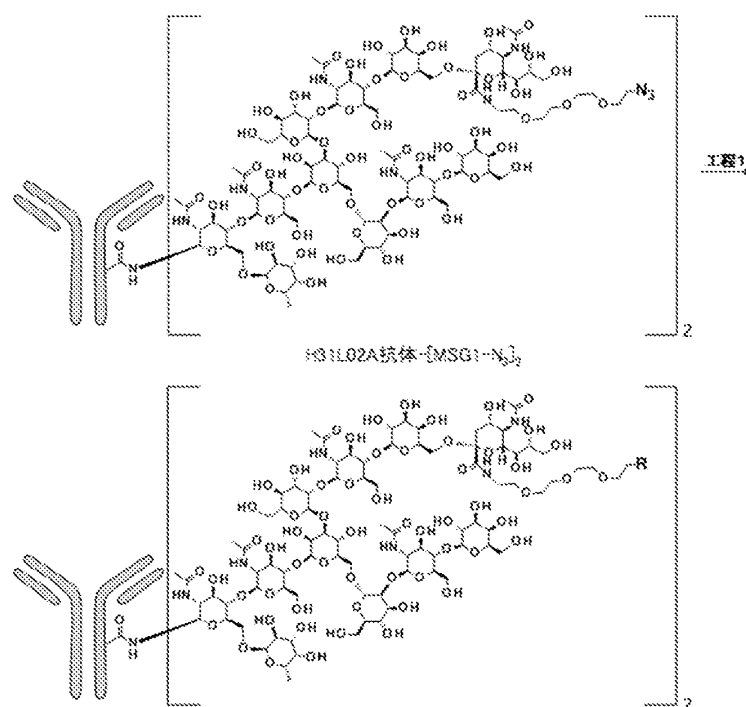
[0567] 特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

[0568] 抗体濃度：1.19 mg/mL，抗体収量：12.5 mg（73%），抗体一分子あたりの平均薬物結合数（n）：1.8

〔実施例22：ADC6〕

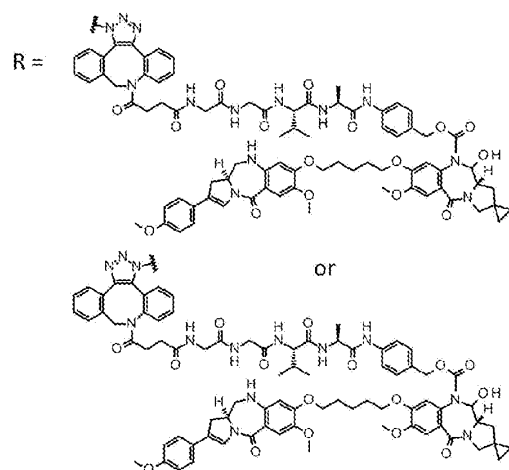
実施例22に記載のADCは、下記の反応式に示すように実施例14の工程2で得られた抗体と実施例10-3工程13で得られた薬物リンカー（3-14）をコンジュゲーションすることによって合成した。式中、Rは実施例で用いられた薬物リンカーを示す。

[0569] [化76]



[0570]

[化77]



[0571] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例22工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例14工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水(pH6.0)溶液(10.1mg/mL, 0.400mL)に、室温にて1,2-プロパンジオール(0.367mL)、実施例10-3工程13にて得られた化合物(3-14)の10mMジメチルスルホキシド溶液(0.0333mL; 抗体1分子に対して12当量)を加え、チューブローテーター(MTR-103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を3.50mL得た。

[0572] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

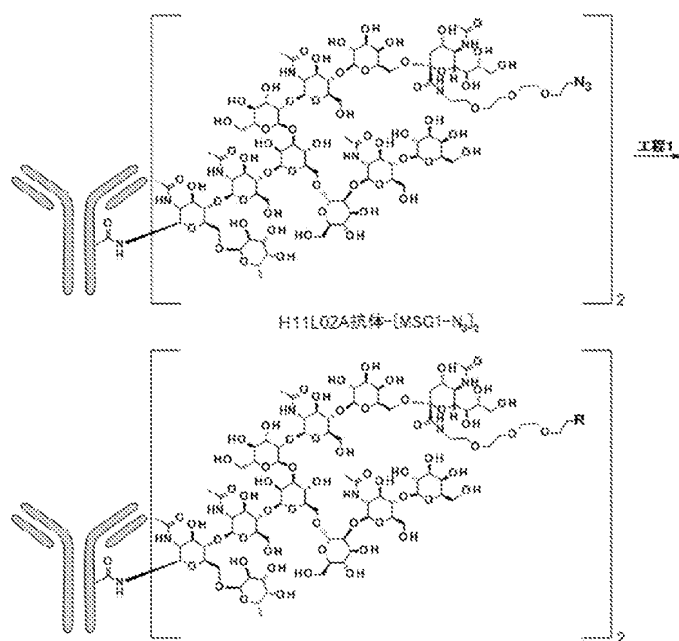
[0573] 抗体濃度：0.820mg/mL, 抗体収量：2.88mg(81%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数(n)：1.9

実施例23~26に記載のADCは、下記の反応式に示すように実施例15の工程2で得られた抗体と実施例10-3~10-6で得られた薬物リン

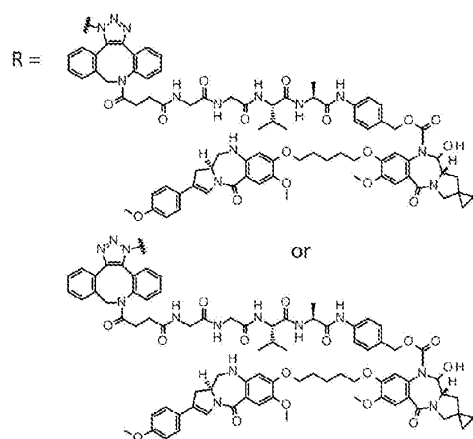
カーをコンジュゲーションすることによって合成した。式中、Rは各実施例で用いられた薬物リンカーによって異なる。

[0574] [実施例23：ADC7]

[0575] [化78]



[0576] [化79]



[0577] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例23工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例15工程2にて得られた抗体の10mM 酢酸緩衝液、5% ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (10.54mg/mL, 0.4mL) に、室温にて1, 2-プロパンジオール (0.100mL)、実施例10-3工程13にて得られた化合物 (3-14) の10mMジメチルスルホキシド溶液 (0.035mL; 抗体1分子に対して12当量) と1, 2-プロパンジオール (0.266mL) の混合溶液を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

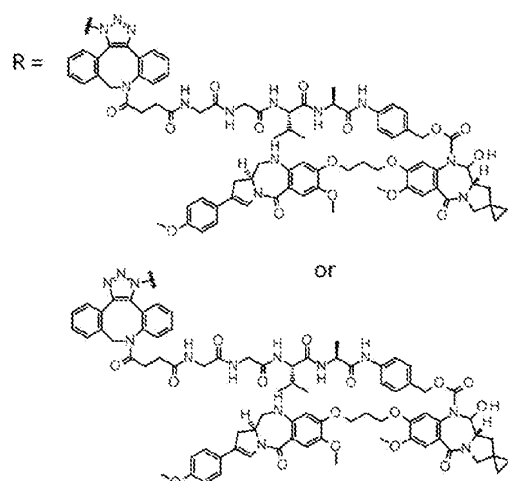
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を2.5mL得た。

[0578] 特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

[0579] 抗体濃度：1.01mg/mL, 抗体収量：2.53mg (73%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n) : 1.9

[実施例24：ADC8]

[0580] [化80]



[0581] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例24工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例15工程2にて得られた抗体の10 mM 酢酸緩衝液、5% ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (2.8 mg/mL, 0.3 mL) に、室温にて1, 2-プロパンジオール (75 μ L)、実施例10-4工程12にて得られた化合物 (4-12) の10 mMジメチルスルホキシド溶液 (7 μ L; 抗体1分子に対して12当量) と1, 2-プロパンジオール (218 μ L) の混合溶液を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

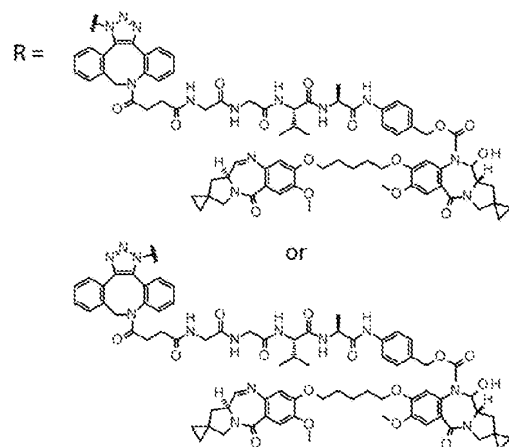
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を2.5 mL得た。

[0582] 特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

[0583] 抗体濃度：0.22 mg/mL, 抗体収量：0.56 mg (67%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n) : 1.8

[実施例25：ADC9]

[0584] [化81]



[0585] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例25工程1

で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例15工程2にて得られた抗体の10mM 酢酸緩衝液、5% ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (2.8mg/mL, 300 μ L) に、室温にて1,2-プロパンジオール (75 μ L)、実施例10-5工程10にて得られた化合物 (5-11) の10mMジメチルスルホキシド溶液 (7 μ L; 抗体1分子に対して12当量) と1,2-プロパンジオール (218 μ L) の混合溶液を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

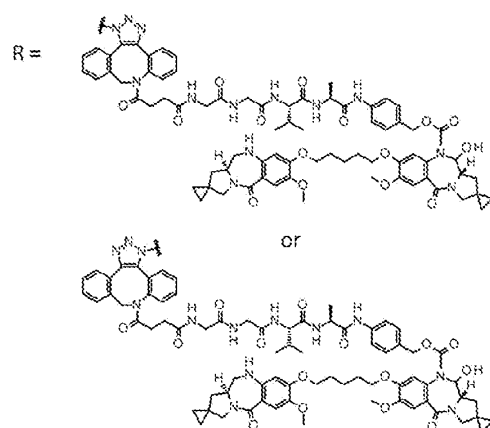
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を2.5mL得た。

[0586] 特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

[0587] 抗体濃度：0.25mg/mL, 抗体収量：0.62mg (64%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n) : 1.8

[実施例26：ADC10]

[0588] [化82]



[0589] (工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例26工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 15 工程 2 にて得られた抗体の 10 mM 酢酸緩衝液, 5 % ソルビトール (pH 5.5) 溶液 (2.8 mg/mL, 300 μ L) に、室温にて 1, 2-プロパンジオール (75 μ L)、実施例 10-6 工程 12 にて得られた化合物 (6-13) の 10 mM ジメチルスルホキシド溶液 (7 μ L; 抗体 1 分子に対して 12 当量) と 1, 2-プロパンジオール (218 μ L) の混合溶液を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作: 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 2.5 mL 得た。

[0590] 特性評価: 共通操作 E, F を用いて下記の特性値を得た。

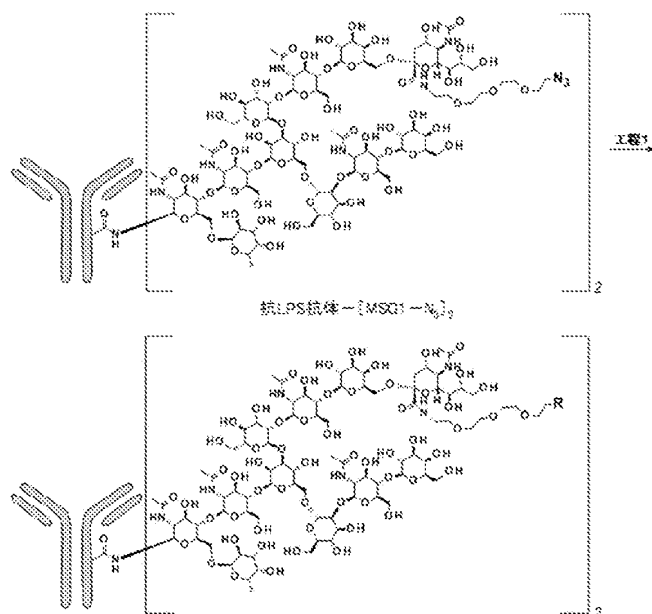
[0591] 抗体濃度: 0.25 mg/mL, 抗体収量: 0.62 mg (74%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n): 1.8

実施例 27 に記載の ADC は、下記の反応式に示すように実施例 16 の工程 2 で得られた抗体と実施例 10-3 工程 13 で得られた薬物リンカー (3-14) をコンジュゲーションすることによって合成した。式中、R は実施例で用いられた薬物リンカーを示す。

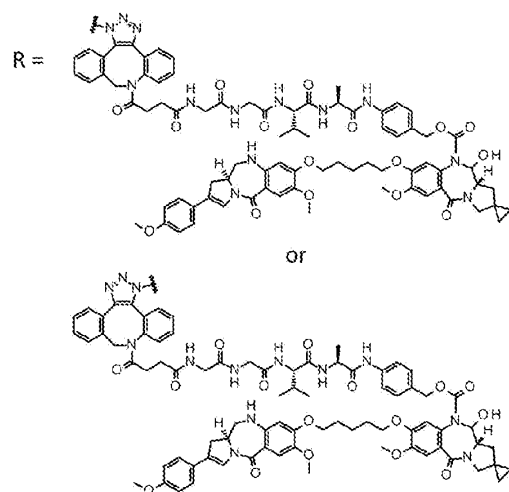
[0592] [実施例 27: ADC 11]

[0593]

[化83]



[0594] [化84]



[0595] 工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例27工程1で得られた化合物は上記式の左右の構造からなるリンカーを混合して保持する。
。)

工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 16 工程 2 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) 溶液 (9.89 mg/mL, 0.40 mL) に、室温にて 1, 2-プロパンジオール (0.367 mL)、実施例 10-3 工程 13 にて得られた化合物 (3-14) を 10 mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0328 mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 2 日間反応させた。

精製操作: 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 2.50 mL 得た。

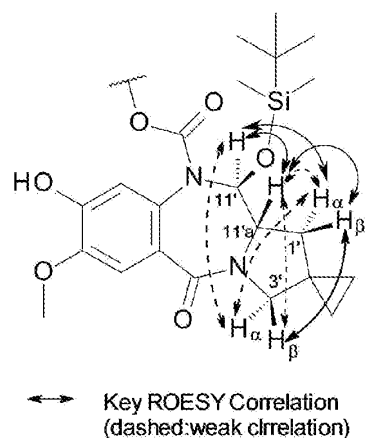
[0596] 特性評価: 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

[0597] 抗体濃度: 1.16 mg/mL, 抗体収量: 2.89 mg (72%), 抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n): 1.8

[実施例 28] 実施例 10-1 に示される化合物 (1-11) の立体配置解析 [実施例 10-1: 中間体 1] に記載の化合物 (1-11) について selective 1D ROESY スペクトルで得られた相関 (下図) より、11' 位の絶対立体配置の解析を行った。1' α -H と 11' -H との間、3' α -H と 11' -H との間、及び 1' β -H と 3' β -H との間に相関が認められることから、11' 位の絶対立体配置は S 配置であることが分かった。

[0598]

[化85]



[0599] Selective 1D ROESYスペクトルで得られた有意な相関

Selective 1D ROESYスペクトル相関測定時に使用した¹H-NMR

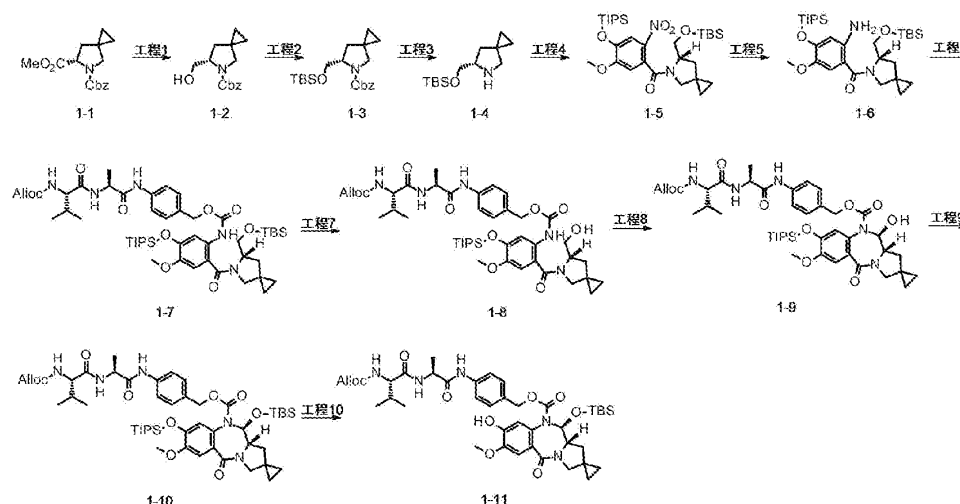
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 27°C) δ: 8.76 (1H, s), 7.43 (2H, brd), 7.20 (1H, s), 7.08 (2H, d, J=8.3 Hz), 7.00 (1H, br), 6.66 (1H, s), 6.44 (1H, s), 6.00 (1H, H-11', d, J_{11'}, 11'a=9.2 Hz), 5.89 (1H, m), 5.53 (1H, brd), 5.30 (1H, d, J=17.2 Hz), 5.20 (1H, d, J=10.3 Hz), 5.15 (1H, d, J_{ABq}=12.5 Hz), 4.85 (1H, d, J_{ABq}=12.5 Hz), 4.66 (1H, m), 4.604.52 (2H, m), 4.07 (1H, m), 3.84 (3H, s), 3.71 (1H, H-3' β, d, J_{gem}=11.7 Hz), 3.53 (1H, H-11'a, m), 3.26 (1H, H-3' α, d, J_{gem}=11.7 Hz), 2.35 (1H, H-1' β, dd, J_{1' β}, 11'a=8.30 Hz, J_{gem}=13.1 Hz), 2.14 (1H, m), 1.54 (1H, H-1' α, d, J_{gem}=13.1 Hz), 1.41 (3H, d, J=

6.90 Hz), 0.95 (3H, d, J=6.80 Hz), 0.92 (3H, d, J=6.80 Hz), 0.81 (9H, s), 0.80–0.70 (1H, m), 0.70–0.59 (3H, m), 0.2–0.06 (6H, m)

従って、[実施例10-1：中間体1]に記載の化合物(1-9)、(1-10)及び(1-11)並びに化合物(1-11)を用いて合成された薬物リンカー1、2及び4並びにこれらの合成中間体11'位の絶対立体配置はS配置であることが分かった。また、同様の合成手法で得られる薬物リンカー3およびその中間体11'位の絶対立体配置もS配置と決定した。

[0600] 従って、[実施例10-1：中間体1]に示される工程1～10は、以下のように表される。

[0601] [化86]



[0602] (1-9) : N-[(プロパン-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキソ-8'-{トリ(プロパン-2-イル)シリル}オキシ}-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

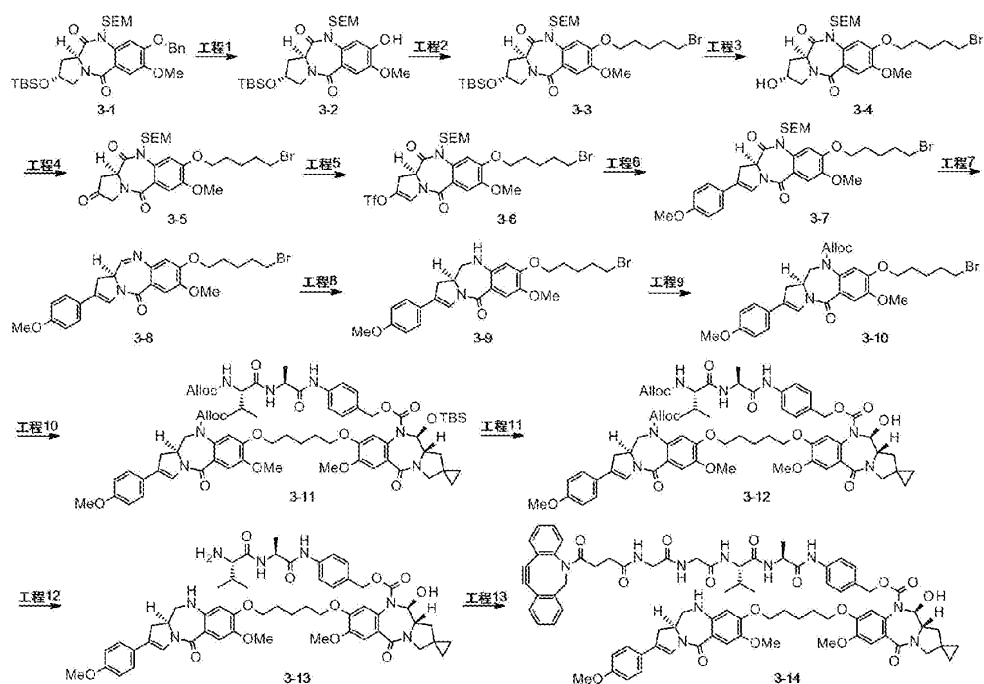
(1-10) : N- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル]
 -L-バリル-N- {4- [({ [(11' S, 11a' S) -11' - {
 [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7' -メトキシ-5'
 -オキソ-8' - { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -11'
 ', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピ
 ロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イ
 ル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

(1-11) : N- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル]
 -L-バリル-N- {4- [({ [(11' S, 11a' S) -11' - {
 [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -8' -ヒドロキシ-7'
 -メトキシ-5' -オキソ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピ
 ロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジ
 アゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェ
 ニル} -L-アラニンアミド

[実施例10-3 : 薬物リンカー1] に示される工程1~13は、以下の
 ように表される。

[0603]

[化87]



[0604] (3-11) : N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[({(11'S, 11a'S)-11'-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7'-メトキシ-8'-[5-({(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-10-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ)ペンチル]オキシ}-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

(3-12) : N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[({(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[5-({(11aS)-7-メトキシ

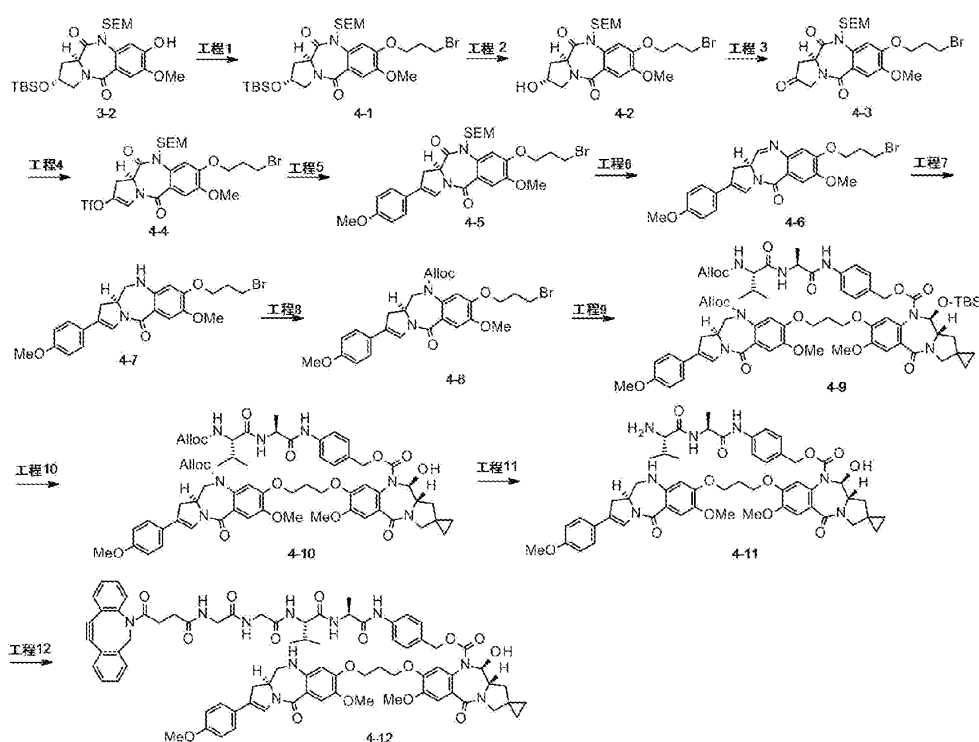
シー２－（４－メトキシフェニル）－５－オキソ－１０－〔（プロプ－２－
エン－１－イルオキシ）カルボニル〕－５，１０，１１，１１ａ－テトラヒ
ドロ－１Ｈ－ピロロ〔２，１－ｃ〕〔１，４〕ベンゾジアゼピン－８－イル
〕オキシ〕ペンチル〕オキシ〕－５’－オキソ－１１’，１１ａ’－ジヒド
ロ－１’Ｈ－スピロ〔シクロプロパン－１，２’－ピロロ〔２，１－ｃ〕〔
１，４〕ベンゾジアゼピン〕－１０’（５’Ｈ）－イル〕カルボニル〕オキ
シ〕メチル〕フェニル〕－Ｌ－アラニンアミド

（３－１３）：Ｌ－バリル－Ｎ－〔４－〔（〔（１１’Ｓ，１１ａ’Ｓ）
－１１’－ヒドロキシ－７’－メトキシ－８’－〔（５－〔（１１ａＳ）
－７－メトキシ－２－（４－メトキシフェニル）－５－オキソ－５，１０，
１１，１１ａ－テトラヒドロ－１Ｈ－ピロロ〔２，１－ｃ〕〔１，４〕ベン
ゾジアゼピン－８－イル〕オキシ〕ペンチル〕オキシ〕－５’－オキソ－１
１’，１１ａ’－ジヒドロ－１’Ｈ－スピロ〔シクロプロパン－１，２’－
ピロロ〔２，１－ｃ〕〔１，４〕ベンゾジアゼピン〕－１０’（５’Ｈ）－
イル〕カルボニル〕オキシ〕メチル〕フェニル〕－Ｌ－アラニンアミド（３
－１３）

（３－１４）：Ｎ－〔４－（１１，１２－ジデヒドロジベンゾ〔b，f〕ア
ゾシン－５（６Ｈ）－イル）－４－オキソブタノイル〕グリシルグリシル－
Ｌ－バリル－Ｎ－〔４－〔（〔（１１’Ｓ，１１ａ’Ｓ）－１１’－ヒド
ロキシ－７’－メトキシ－８’－〔（５－〔（１１ａＳ）－７－メトキシ
－２－（４－メトキシフェニル）－５－オキソ－５，１０，１１，１１ａ－
テトラヒドロ－１Ｈ－ピロロ〔２，１－ｃ〕〔１，４〕ベンゾジアゼピン－
８－イル〕オキシ〕ペンチル〕オキシ〕－５’－オキソ－１１’，１１ａ’
－ジヒドロ－１’Ｈ－スピロ〔シクロプロパン－１，２’－ピロロ〔２，１
－ｃ〕〔１，４〕ベンゾジアゼピン〕－１０’（５’Ｈ）－イル〕カルボニ
ル〕オキシ〕メチル〕フェニル〕－Ｌ－アラニンアミド

〔実施例１０－４：薬物リンカー２〕に示される工程１～１２は、以下の
ように表される。

[0605] [化88]



[0606] (4-9) : N- { [(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル } -L-バリル-N- [4- ({ [(11' S, 11' a S) -11' - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7'-メトキシ-8' - (3- { [(11 a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-10- { [(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル} -5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド

(4-10) : N- { [(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル } -L-バリル-N- [4- ({ [(11' S, 11' a S) -11' -

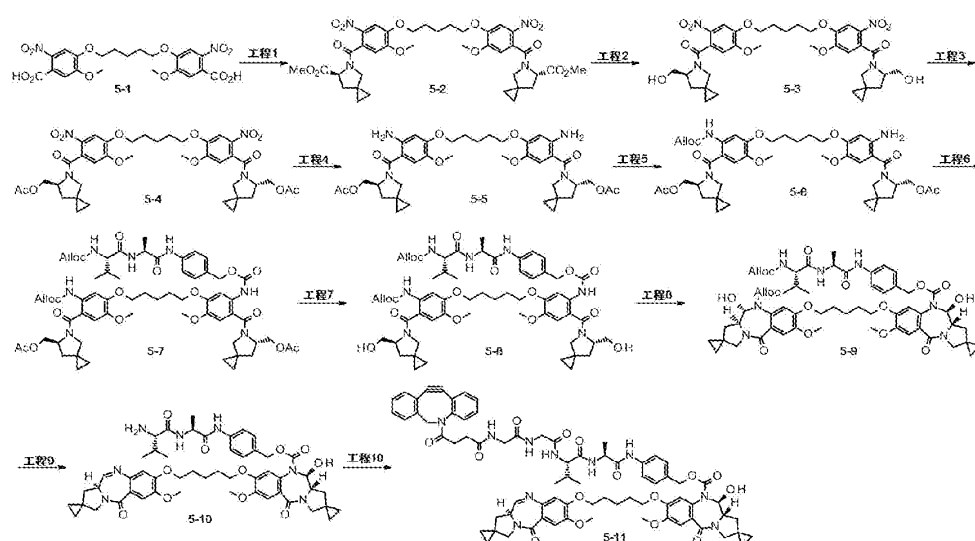
ーヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11 a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-10- { [(プロプ-2-エン-1-イル) オキシ] カルボニル} -5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド

(4-11) : L-バリル-N- [4- ({ [(11' S, 11' a S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11 a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド

(4-12) : N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N- [4- ({ [(11' S, 11' a S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11 a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド

【実施例10-5：薬物リンカー3】に示される工程1～10は、以下のよう表される。

[0607] [化89]



[0608] (5-9) : N-[(2-プロペン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11a' S) -11'-ヒドロキシ-8' - { [5- ({[(11' S, 11a' S) -11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキソ-10' - [(2-プロペン-1-イルオキシ)カルボニル]-5', 10', 11', 11a'-テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'-イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H)-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル}-L-アラニンアミド

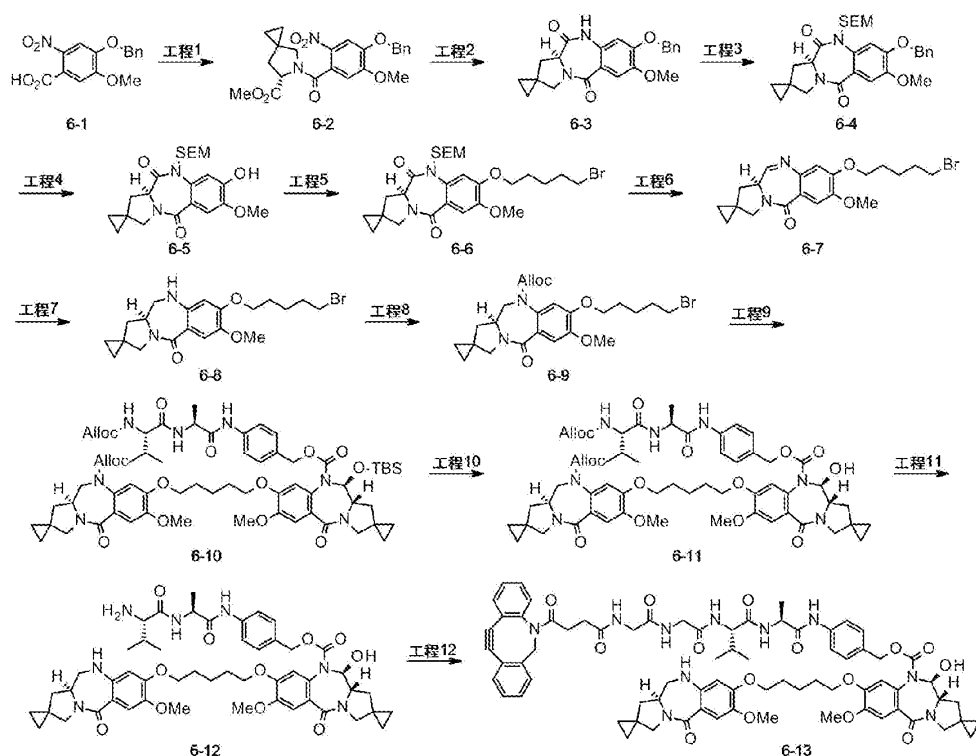
(5-10) : L-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11a' S) -11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7'-メトキシ-5'-オキソ-5', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'-イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2-

’-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10’ (5’ H)
)-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド
 (5-11) : N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] ア
 ゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-
 L-バリル-N-{4-[({[(11’ S, 11a’ S)-11’-ヒド
 ロキシ-7’-メトキシ-8’-[(5-{[(11a’ S)-7’-メト
 キシ-5’-オキソ-5’, 11a’-ジヒドロ-1’ H-スピロ [シクロ
 プロパン-1, 2’-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン]
 -8’-イル] オキシ} ペンチル) オキシ]-5’-オキソ-11’, 11
 a’-ジヒドロ-1’ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2’-ピロロ [2
 , 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10’ (5’ H)-イル] カル
 ボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

[実施例 10-6 : 薬物リンカー 4] に示される工程 1 ~ 12 は、以下の
 ように表される。

[0609]

[化90]



[0610] (6-10) : N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]
 -L-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11a' S) -11' - {
 [tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ} -7' -メトキシ-8'
 - {[5- ({[(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-10' -
 [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル] -5', 10', 1
 1', 11a' -テトラヒドロ' H-スピロ[シクロプロパン-1, 2' -
 ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン] -8' -イル} オキシ
)ペンチル]オキシ} -5' -オキソ-11', 11a' -ジヒドロ-1'
 H-スピロ[シクロプロパン-1, 2' -ピロロ[2, 1-c][1, 4]
 ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル]カルボニル} オキシ)メチ
 ル]フェニル} -L-アラニンアミド

(6-11) : N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]
 -L-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11a' S) -11' -ヒ

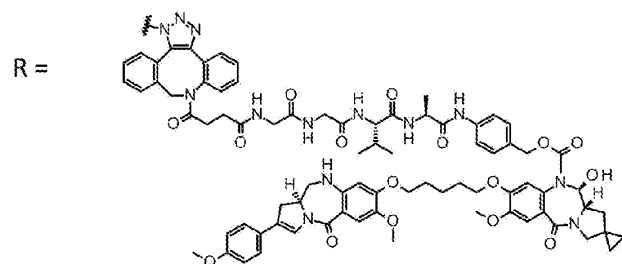
ドロキシ-7' -メトキシ-8' - { [5- ({ (11 a' S) -7' -メ
トキシ-5' -オキソ-10' - [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)
カルボニル] -5' , 10' , 11' , 11 a' -テトラヒドロ-1' H-
スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベン
ゾジアゼピン] -8' -イル} オキシ) ペンチル] オキシ} -5' -オキソ
-11' , 11 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2
' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H
) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド
(6-12) : L-バリル-N- {4- [({ [(11' S, 11 a' S)
-11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11 a' S
) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 10' , 11' , 11 a' -テ
トラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1
-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オ
キシ] -5' -オキソ-11' , 11 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シ
クロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピ
ン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル}
-L-アラニンアミド

(6-13) : N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f]
アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル
-L-バリル-N- {4- [({ [(11' S, 11 a' S) -11' -ヒ
ドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11 a' S) -7' -メ
トキシ-5' -オキソ-5' , 10' , 11' , 11 a' -テトラヒドロ-
1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1,
4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5'
-オキソ-11' , 11 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン
-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10'
(5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニ
ンアミド

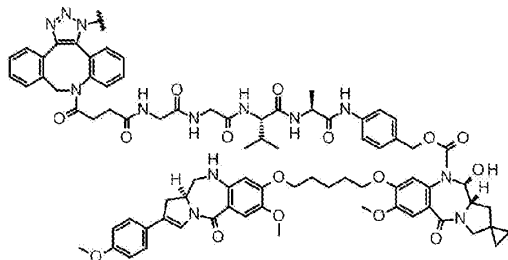
また、実施例 17～27 で得られる ADC の式中 R は以下である。

[0611] 実施例 17, 21, 22, 23 又は 27 に記載の R :

[0612] [化91]



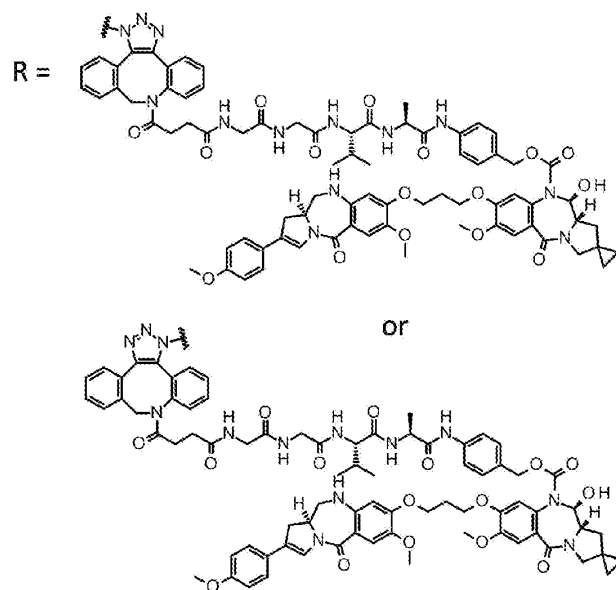
又は



[0613] 実施例 18 又は 24 に記載の R :

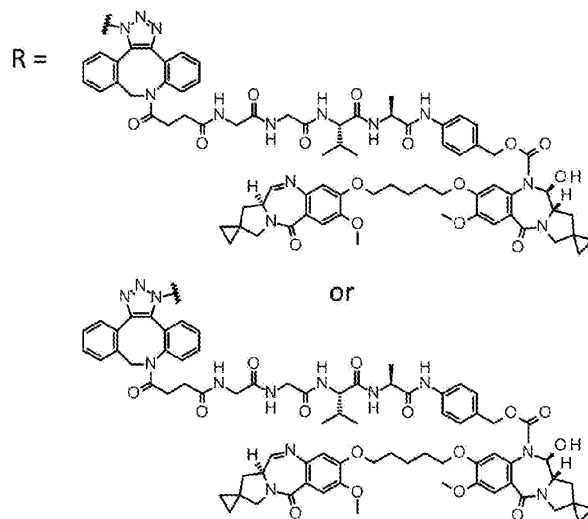
[0614]

[化92]



[0615] 実施例 19 又は 25 に記載の R :

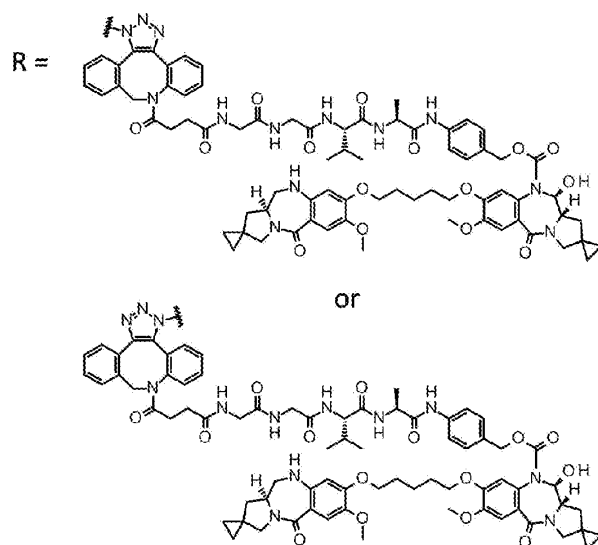
[0616] [化93]



[0617] 実施例 20 又は 26 に記載の R :

[0618]

[化94]



[0619] [参考例2：NOV0712-薬物コンジュゲートの作製]

参考例2) - 1 抗体-薬物コンジュゲートの作製 NOV0712-D
M4

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：参考例1にて作製したNOV0712を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.51mLmg⁻¹cm⁻¹を使用）及びCを用いて、20mM HEPES 8.1（LIFE TECHNOLOGIES社製 HEPES, 1M Buffer Solution（20mL）を1M水酸化ナトリウムでpH8.1とした後、蒸留水にて1Lとした）にて9.7mg/mLに調製し、20℃で10分間インキュベートした。次いでWO2016/024195号公開特許公報に記載の10mM 1-（2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ）-1-オキソ-4-（ピリジン-2-イルジスルファニル）ブタン-2-スルホン酸のDMA溶液（0.366mL；抗体一分子に対して5.2当量）、10mM N2'-デアセチル-デアセチル-N2'-（4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル）-メイトンシ

ン (DM4) のDMA溶液 (0.366 mL ; 抗体一分子に対して6.8当量)、及び0.243 mLのDMAを加え、20℃で16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、1 M 酢酸水溶液を加え pH 5.0とし、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0620] 精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲート「NOV0712-DM4」を含有する溶液を28 mL得た。

[0621] 特性評価：製造方法1に記載した共通操作E (ϵ_A , 280=200500、 ϵ_A , 252=76295、 ϵ_D , 280=43170、及び ϵ_D , 252=23224を使用)を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.58 mg/mL, 抗体収量：72.2 mg (93%), 共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの平均薬物結合数 (n) : 3.0。

[0622] [実施例29：抗体-薬物コンジュゲートの *in vitro* 活性評価]
CDH6陽性ヒト腫瘍細胞株に対する抗体-薬物コンジュゲートの *in vitro* 細胞増殖抑制活性評価

実施例2) - 3にてCDH6の発現を確認した、ヒト卵巣腫瘍細胞株NIH: OVCAR-3, OV-90, PA-1及びヒト腎細胞腫瘍細胞株786-O (全てATCCから入手) を37℃、5% CO₂の条件下で培養した後、図9に示す各細胞株の播種数/100 µL/wellになるよう96ウェルプレートに播種し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した。翌日、実施例27で作製したADC11、実施例17で作製したADC1、実施例21で作製したADC5、実施例23で作製したADC7、又は実施例22で作製したADC6を、終濃度100 (nM) から0.000256 (nM) になるように、5倍公比で希釈した抗体-薬物コンジュゲートを添加した。6日間培養後に生存細胞数をCellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega) によるATPの定量で測定した。細胞増殖抑制活性としてのIC50

値は次式で算出し、小数点第3位を四捨五入し小数点第2位まで表記した。

$$IC50 (nM) = \text{anti log} \left((50 - d) \times (\text{LOG}10 (b) - \text{LOG}10 (a)) \div (d - c) + \text{LOG}10 (b) \right)$$

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 $a > b$

図 9 に抗体-薬物コンジュゲートを各々添加した際の IC50 (nM) を示した。In vitro での CDH6 発現量が高い卵巢腫瘍細胞株 3 株では、CDH6 へ結合しない抗体-薬物コンジュゲートである ADC11 の IC50 値に比べて、3 種の抗 CDH6 抗体の薬物コンジュゲートの IC50 値は極めて低いことから、CDH6 の発現に特異的な非常に強い細胞増殖抑制活性を有することが示された。また、抗体の CDH6 への結合活性 (表 3) と、抗体-薬物コンジュゲートの細胞増殖抑制活性に相関が認められた。In vitro での CDH6 発現量が低い腎細胞腫瘍細胞株においても、同様の傾向が認められた (図 9)。

[0623] [実施例 30 : 抗体-薬物コンジュゲートの in vivo 抗腫瘍効果 1]

抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、CDH6 陽性ヒト腫瘍細胞株の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。4-5 週齢の BALB/c ノードマウス (CAnN, Cg-Foxnl [nu] / CrICrIj [Foxnl nu / Foxnl nu]、日本チャールス・リバー) 及び、SCID マウス (CB17 / lcr-Prkdc [scid] / CrICrIj、日本チャールス・リバー) を実験使用前に SPF 条件化で 3 日間以上馴化した。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 (5-15 ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製) を与えた。移植し

た腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルノギス（CD-15CX, Mitutoyo Corp.）で1週間に2回測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2$$

抗体-薬物コンジュゲートは全てABS緩衝液（10mM-Acetate Buffer, 5% Sorbitol, pH5.5）（NACALAL）で希釈し、各実施例に示す用量にて尾静脈内投与した。また、コントロール群（Vehicle群）としてABS緩衝液を同様に投与した。1群あたり6匹のマウスを実験に用いた。

[0624] 30) - 1 抗腫瘍効果 (1)

実施例2) - 3にてCDH6の発現を確認した、CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株OV-90 (ATCC) をマトリゲル（コーニング社）に懸濁し、 2.5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Day 0）、Day 14に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例17で作製したADC1、又は実施例27で作製したADC11を、0.4 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。また、参考例2) - 1で作製したNOV0712-DM4を、10 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図10に示す。横軸は投与後日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0625] 本腫瘍モデルにおいて、NOV0712-DM4は投与後30日後から腫瘍の再増殖が認められたが、ADC1は0.4 mg/kgの非常に低い用量で強力な腫瘍退縮効果を示し、投与後42日間の長期にわたって強い抗腫瘍効果が持続した。抗腫瘍試験に用いるマウス及び移植されたヒト腫瘍細胞のいずれにも結合を示さない、コントロールとしてのADC11は抗腫瘍効果を示さなかった。全ての薬剤投与群において、対照群であるABS緩衝液投与群と比較したマウスの体重減少は認められなかった。

[0626] 30) - 2 抗腫瘍効果 (2)

実施例2) - 3にてCDH6の発現を確認した、CDH6陽性ヒト腎細胞

腫瘍細胞株Caki-1 (ATCC) をマトリゲル (コーニング社) に懸濁し、 2.5×10^6 cells を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し (Day 0)、Day 13 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 17 で作製した抗体-薬物コンジュゲートADC1、又は実施例 27 で作製したADC11 を、 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、参考例 2) - 1 で作製したNOV0712-DM4 を、 10 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図 11 に示す。横軸は投与後日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE 値を示す。

[0627] 本腫瘍モデルにおいてNOV0712-DM4 は 10 mg/kg の用量で抗腫瘍効果を示さなかった。一方、ADC1 は 0.4 mg/kg の非常に低い用量で抗腫瘍効果を発揮した。抗腫瘍試験に用いるマウス及び移植されたヒト腫瘍細胞のいずれにも結合を示さない、コントロールとしてのADC11 は、 0.4 mg/kg で抗腫瘍効果を示さなかった (図 11)。すなわち、ADC1 の示す抗腫瘍効果は腫瘍細胞でのCDH6 発現に依存した特異的な作用であることが示された。本発明のADC1 は、先行技術であるNOV0712-DM4 と比較して抗腫瘍効果が非常に優れた抗体-薬物コンジュゲートであることが示された。全ての薬剤投与群において、対照群であるABS 緩衝液投与群と比較したマウスの体重減少は認められなかった。

[0628] 30) - 3 抗腫瘍効果 (3)

実施例 2) - 3 にてCDH6 の発現を確認した、CDH6 陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株NIH: OVCAR-3 (ATCC) をマトリゲル (コーニング社) に懸濁し、 1×10^7 cells を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し (Day 0)、Day 28 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 17 で作製したADC1、実施例 21 で作製したADC5、実施例 22 で作製したADC6、又は実施例 27 で作製したADC11 を、 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図 12 に示す。横軸は投与後日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE 値を示す。

[0629] 本腫瘍モデルにおいて、ADC6 が最も強い抗腫瘍効果を示し、次いでA

ADC 1 及び ADC 5 がほぼ同等の抗腫瘍効果を示した。すなわち、抗体－薬物コンジュゲートとしての抗腫瘍効果において、ヒト抗体重鎖の E U i n d e x により特定される 234 位、235 位のロイシンをアラニンへ置換したことによる影響はほぼ無いことが示された。コントロールとしての ADC 11 は、0.4 mg/kg で抗腫瘍効果を示さなかった（図 12）。すなわち、ADC 1、ADC 5 及び ADC 5 の示す抗腫瘍効果は腫瘍細胞での CDH 6 発現に依存した特異的な作用であることが示された。全ての薬剤投与群において、対照群である ABS 緩衝液投与群と比較したマウスの体重減少は認められなかった。

[0630] 30)－4 抗腫瘍効果 (4)

実施例 2)－3 にて CDH 6 の発現を確認した、CDH 6 陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株 OV-90 (ATCC) をマトリゲル (コーニング社) に懸濁し、 2.5×10^6 cells を雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し (Day 0)、Day 17 に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例 17 で作製した ADC 1、実施例 21 で作製した ADC 5、実施例 23 で作製した ADC 7、又は実施例 22 で作製した ADC 6 を、0.2 mg/kg 又は 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図 13 に示す。横軸は投与後日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲は SE 値を示す。

[0631] 本腫瘍モデルにおいて、ADC 5 及び ADC 6 の 0.4 mg/kg 投与が最も強い抗腫瘍効果を示し、次いで ADC 7 の 0.4 mg/kg 投与が強い抗腫瘍効果を示した（図 13）。また、ADC 5 の 0.4 mg/kg 投与と 0.2 mg/kg 投与の結果から、用量依存的な抗腫瘍効果を確認した。0.2 mg/kg 投与において ADC 1 及び ADC 5 がほぼ同等の抗腫瘍効果を示した。すなわち、抗体－薬物コンジュゲートとしての抗腫瘍効果において、ヒト抗体重鎖の E U i n d e x により特定される 234 位、235 位のロイシンをアラニンへ置換したことによる影響はほぼ無いことが示された。全ての薬剤投与群において、対照群である ABS 緩衝液投与群と比較したマウスの体重減少は認められなかった。

[0632] 30) - 5 抗腫瘍効果 (5)

実施例2) - 3にてCDH6の発現を確認した、CDH6陽性ヒト卵巣腫瘍細胞株PA-1(ATCC)をマトリゲル(コーニング社)に懸濁し、 5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 17に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例21で作製したADC5、実施例22で作製したADC6又は実施例27で作製したADC11を、 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図14に示す。横軸は投与後日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0633] 本腫瘍モデルにおいて、ADC5が最も強い抗腫瘍効果を示し、35日間の長期に渡って腫瘍の消失を確認した。次いでADC6が強い抗腫瘍効果を示した(図14)。全ての薬剤投与群において、対照群であるABS緩衝液投与群と比較したマウスの体重減少は認められなかった。

[0634] 30) - 6 抗腫瘍効果 (6)

実施例2) - 3にてCDH6の発現を確認した、CDH6陽性ヒト腎細胞腫瘍細胞株786-O(ATCC)をマトリゲル(コーニング社)に懸濁し、 5×10^6 cellsを雄SCIDマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 38に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例21で作製したADC5、実施例22で作製したADC6を、 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、実施例27で作製したADC11を、 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図15に示す。横軸は投与後日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0635] 本腫瘍モデルにおいて、ADC5及びADC6は強い抗腫瘍効果を示した(図15)。コントロールとしてのADC11は、抗腫瘍効果を示さなかった(図15)。すなわち、ADC5及びADC6の示す抗腫瘍効果は腫瘍細胞でのCDH6発現に依存した特異的な作用であることが示された。全ての薬剤投与群において、対照群であるABS緩衝液投与群と比較したマウスの体重減少は認められなかった。

産業上の利用可能性

- [0636] 本発明により、内在化活性を有する抗CDH6抗体及び該抗体を含む抗体－薬物コンジュゲートが提供された。該抗体－薬物コンジュゲートは癌に対する治療薬等として用いることができる。

配列表フリーテキスト

- [0637] 配列番号1：ヒトCDH6 ORF
配列番号2：EC1
配列番号3：EC2
配列番号4：EC3
配列番号5：EC4
配列番号6：EC5
配列番号7：カニクイザルCDH6 ORF
配列番号8：カニクイザルCDH6 プライマー1
配列番号9：カニクイザルCDH6 プライマー2
配列番号10：rG019の軽鎖の可変領域アミノ酸配列
配列番号11：rG019の軽鎖の可変領域ヌクレオチド配列
配列番号12：rG019 CDR L1
配列番号13：rG019 CDR L2
配列番号14：rG019 CDR L3
配列番号15：rG019の重鎖の可変領域アミノ酸配列
配列番号16：rG019の重鎖の可変領域ヌクレオチド配列
配列番号17：rG019 CDR H1
配列番号18：rG019 CDR H2
配列番号19：rG019 CDR H3
配列番号20：ヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片
配列番号21：ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片

配列番号 22 : c h G 0 1 9 軽鎖をコードする D N A 断片を含む D N A 断片

配列番号 23 : c h G 0 1 9 軽鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 24 : c h G 0 1 9 軽鎖全長ヌクレオチド配列

配列番号 25 : c h G 0 1 9 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列

配列番号 26 : c h G 0 1 9 重鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 27 : c h G 0 1 9 重鎖全長ヌクレオチド配列

配列番号 28 : c h G 0 1 9 重鎖可変領域 アミノ酸配列

配列番号 29 : c h G 0 1 9 重鎖可変領域ヌクレオチド配列

配列番号 30 : c h G 0 1 9 C D R H 2

配列番号 31 : h L 0 2 の軽鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 32 : h L 0 2 の軽鎖全長ヌクレオチド配列

配列番号 33 : h L 0 2 の軽鎖可変領域 アミノ酸配列

配列番号 34 : h L 0 2 の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列

配列番号 35 : h L 0 3 の軽鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 36 : h L 0 3 の軽鎖全長ヌクレオチド配列

配列番号 37 : h L 0 3 の軽鎖可変領域 アミノ酸配列

配列番号 38 : h L 0 3 の軽鎖可変領域ヌクレオチド配列

配列番号 39 : h H 0 1 の重鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 40 : h H 0 1 の重鎖全長ヌクレオチド配列

配列番号 41 : h H 0 1 の重鎖可変領域 アミノ酸配列

配列番号 42 : h H 0 1 の重鎖可変領域ヌクレオチド配列

配列番号 43 : h H 0 2 の重鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 44 : h H 0 2 の重鎖全長ヌクレオチド配列

配列番号 45 : h H 0 2 の重鎖可変領域 アミノ酸配列

配列番号 46 : h H 0 2 の重鎖可変領域ヌクレオチド配列

配列番号 47 : h H 0 4 の重鎖全長 アミノ酸配列

配列番号 48 : h H 0 4 の重鎖全長ヌクレオチド配列

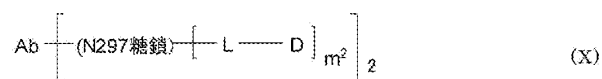
配列番号 49 : h H 0 4 の重鎖可変領域 アミノ酸配列

- 配列番号 50 : h H 0 4 の重鎖可変領域ヌクレオチド配列
- 配列番号 51 : N O V 0 7 1 2 軽鎖全長アミノ酸配列
- 配列番号 52 : 配列番号 51 に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 53 : N O V 0 7 1 2 重鎖全長アミノ酸配列
- 配列番号 54 : 配列番号 53 に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 55 : h H 1 1 の重鎖可変領域アミノ酸配列
- 配列番号 56 : h H 1 1 の重鎖可変領域ヌクレオチド配列
- 配列番号 57 : h H 1 1 C D R H 1
- 配列番号 58 : h H 1 1 C D R H 2
- 配列番号 59 : h H 1 1 C D R H 3
- 配列番号 60 : h H 3 1 の重鎖可変領域アミノ酸配列
- 配列番号 61 : h H 3 1 の重鎖可変領域ヌクレオチド配列
- 配列番号 62 : h H 3 1 C D R H 1
- 配列番号 63 : h H 3 1 C D R H 2
- 配列番号 64 : h H 3 1 C D R H 3
- 配列番号 65 : h H 0 1 A の重鎖全長アミノ酸配列
- 配列番号 66 : h H 0 1 A の重鎖全長ヌクレオチド配列
- 配列番号 67 : h H 1 1 A の重鎖全長アミノ酸配列
- 配列番号 68 : h H 1 1 A の重鎖全長ヌクレオチド配列
- 配列番号 69 : h H 3 1 A の重鎖全長アミノ酸配列
- 配列番号 70 : h H 3 1 A の重鎖全長ヌクレオチド配列
- 配列番号 71 : ヒト重鎖シグナル配列及びヒト I g G 1 L A L A 定常領域のアミノ酸をコードする DNA 配列を含む DNA 断片
- 配列番号 72 : 抗 L P S 抗体軽鎖全長アミノ酸配列
- 配列番号 73 : 抗 L P S 抗体重鎖全長アミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 次式 (X) :

[化1]

(式中、 m^2 は1又は2の整数を示し、

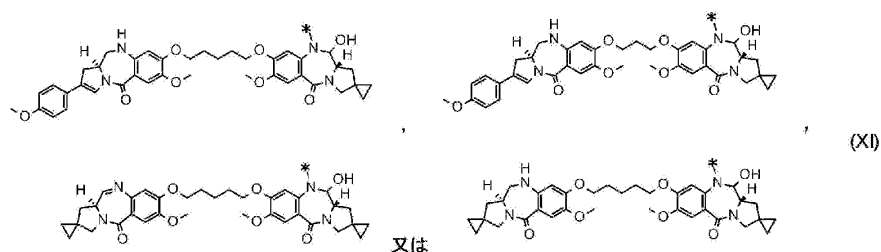
A b は、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

L は、A b のN 2 9 7 に結合する糖鎖 (N 2 9 7 糖鎖) とD を連結するリンカーであり、

N 2 9 7 糖鎖は、リモデリングされていてもよい糖鎖を示し、

D は、以下 :

[化2]



から選択されるいずれか1つであり、式中、*はLと結合していることを示す)

で示される抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項2] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列への結合に対して、以下の(1)～(8) :

(1) 配列番号23の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号26の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

(2) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号39の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

(3) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

(4) 配列番号35の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

(5) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号47の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

(6) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

(7) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、及び

(8) 配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する抗体、

からなる群から選択される抗体のうち少なくともいずれか1つと競合阻害活性を示す、

請求項1に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項3] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(4)：

(1) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号17に記

載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号18に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

(2) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号30に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

(3) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び

(4) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、及び、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、

からなる群から選択されるCDRL1、CDRL2及びCDRL3、及び、CDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む、

請求項1又は2のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項4]

前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(4)：

- (1) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
- (2) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、
- (3) (1)又は(2)のアミノ酸配列において各CDR配列以外の

フレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び

(4) (1)～(3)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

からなる群から選択されるいずれか1つに記載の軽鎖可変領域、並びに、

以下の(5)～(11)：

(5) 配列番号41に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(6) 配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(7) 配列番号49に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(8) 配列番号55に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(9) 配列番号60に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(10) (5)～(9)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び

(11) (5)～(10)のアミノ酸配列において各CDR配列以外のフレームワーク領域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

からなる群から選択されるいずれか1つに記載の重鎖可変領域、を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項5] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(6)：

(1) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号41に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(2) 配列番号33に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号45に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(3) 配列番号37に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び

配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(4) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び
配列番号 4 9 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(5) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び
配列番号 5 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は

(6) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び
配列番号 6 0 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、

を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項6]

前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の (1) ～ (7) :

(1) 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 3 9 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(2) 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 4 3 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(3) 配列番号 3 5 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 4 3 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(4) 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 4 7 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(5) 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 6 5 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

(6) 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 6 7 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

又は

(7) 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖
及び配列番号 6 9 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、

のいずれかを有する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

- [請求項7] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号39の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項8] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項9] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号35の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号43の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項10] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号47の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項11] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号65の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項12] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号67の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項13] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号31の21～233番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号69の20～471番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する請求項6に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項14] Lが、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-*$ で示され、

式中、*は前記DのN10'位の窒素原子と結合していることを示し、

Bは、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基又は2,5-チエニル基であり、

Lpは、以下：

$-GGVA-$ 、 $-GG-(D-)VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ 、 $-GGPI-$ 、 $-GGVCit-$ 、 $-GGVK-$ 、及び、 $-GGPL-$ 、

からなる群から選択されるいずれか1つを示し、

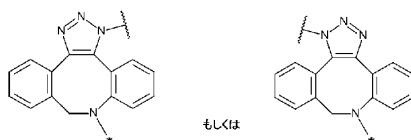
Laは、以下：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、及び、
 $-OC(=O)-$ 、

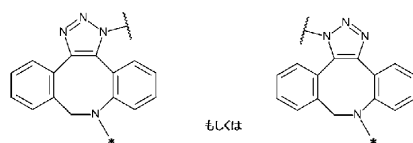
からなる群から選択されるいずれか1つを示し、並びに、

Lbは、次式：

[化3]

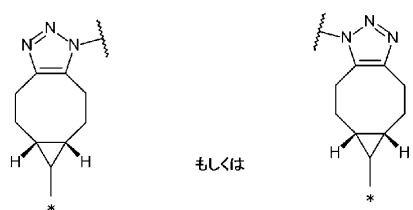


[化4]



、又は、

[化5]

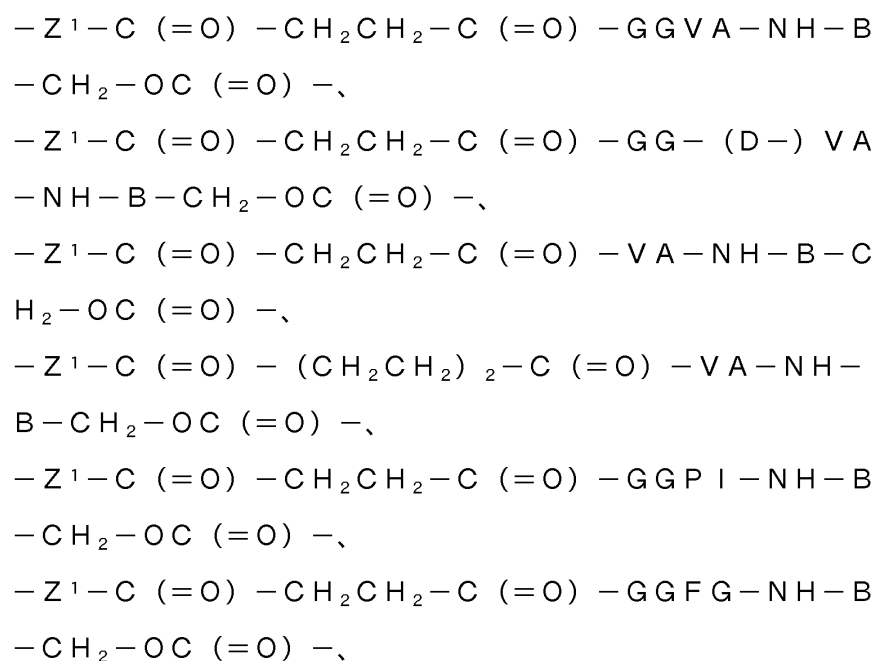


(ここで、上記で示されるL bの構造式において、*はL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)で示される、

請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項15]

Lが、以下：

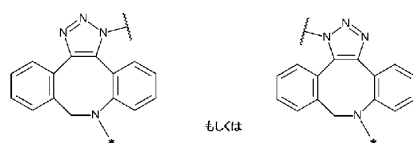


$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-$
 $-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B-$
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPL-NH-B-$
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、及び
 $-Z^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

からなる群から選択されるいずれか1つを示し、

ここで、 Z^1 は、以下の構造式：

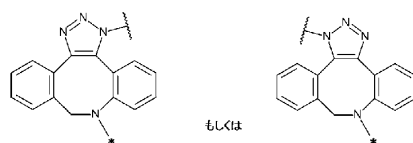
[化6]



を示し、

Z^2 は、以下の構造式：

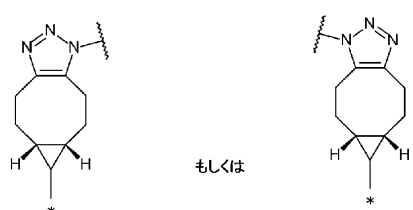
[化7]



を示し、

 Z^3 は、以下の構造式：

[化8]



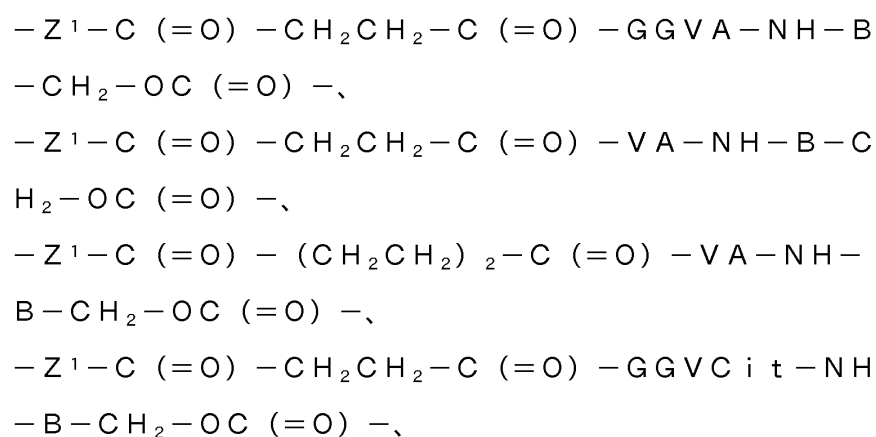
を示し、

ここで、 Z^1 、 Z^2 及び Z^3 の構造式において、*は Z^1 、 Z^2 又は Z^3 に隣接するC(=O)、O又は CH_2 と結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示し、並びに、

Bは、1,4-フェニル基を示す、

請求項1～14のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項16] Lが、以下：

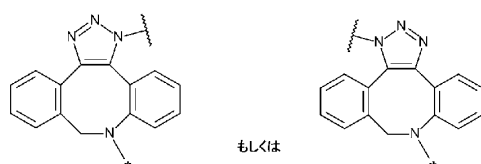


$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 ー、及び
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

からなる群から選択されるいずれか1つを示し、

ここで、Bは1, 4-フェニル基であり、 Z^1 は以下の構造式：

[化9]



を示し、

ここで、 Z^1 の構造式において、*は Z^1 に隣接する $C(=O)$ と結合していることを示し、波線はAbのN297に結合する糖鎖(N297糖鎖)又はそのリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

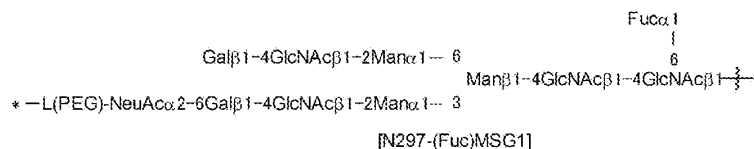
[請求項17] 抗体が、IgG1、IgG2又はIgG4である、請求項1～16のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項18] N297糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

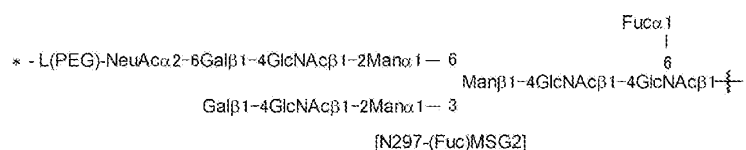
[請求項19] N297糖鎖が、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGである、請求項1～18のいずれか1

項に記載の抗体－薬物コンジュゲート：

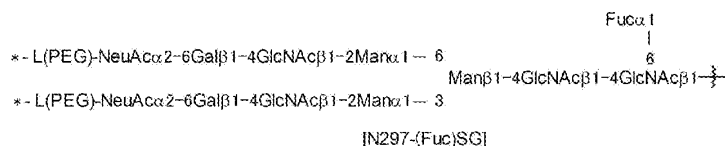
[化10]



[化11]



[化12]



式中、波線は抗体のA s n 2 9 7（N 2 9 7）に結合していることを示し、

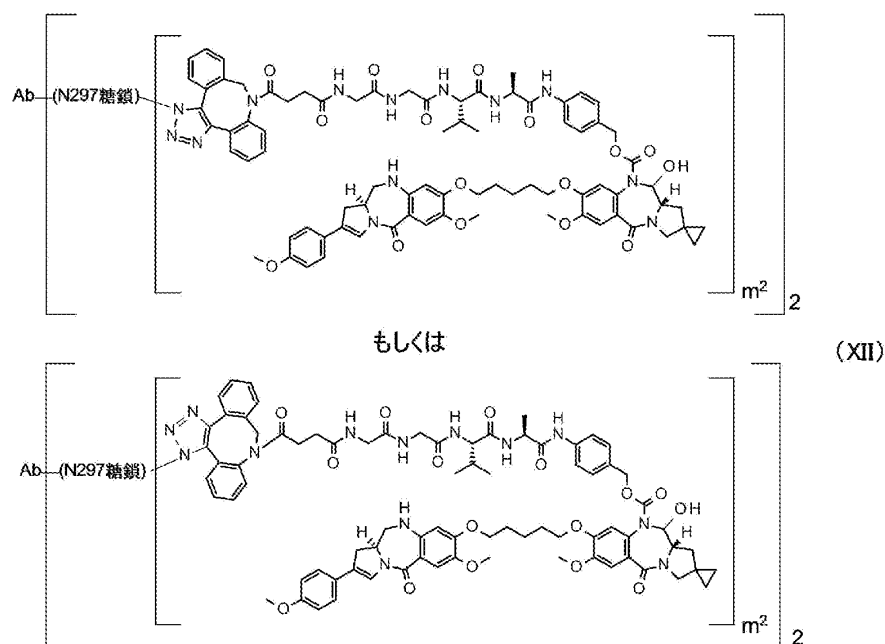
N 2 9 7糖鎖中の* - L（PEG） - は、* -（CH₂CH₂-O）ⁿ - CH₂CH₂-NH - を示し、

ここで、ⁿは2～5の整数であることを示し、右端のアミノ基がN 2 9 7糖鎖のβ - Ma nの分岐鎖の1 - 3鎖側又は／及び1 - 6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す。

[請求項20] ⁿが3である、請求項19に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項21] 次の式（X I I）：

[化13]



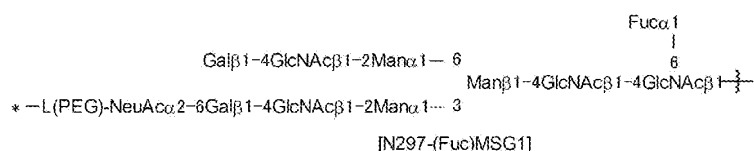
で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

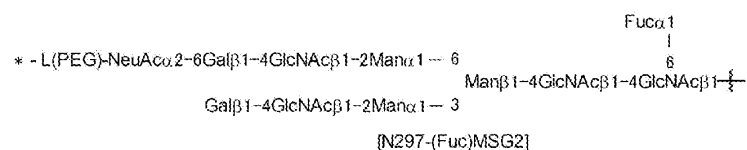
A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

A bのN 2 9 7糖鎖は次式で示される構造を有するN 2 9 7-(F u c) M S G 1、N 2 9 7-(F u c) M S G 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7-(F u c) S Gのいずれか1つであることを示し、

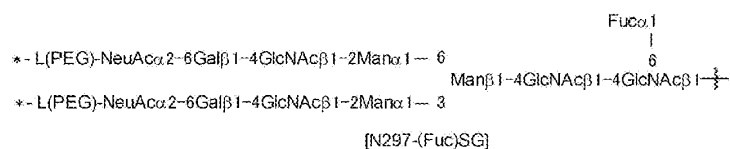
[化14]



[化15]



[化16]



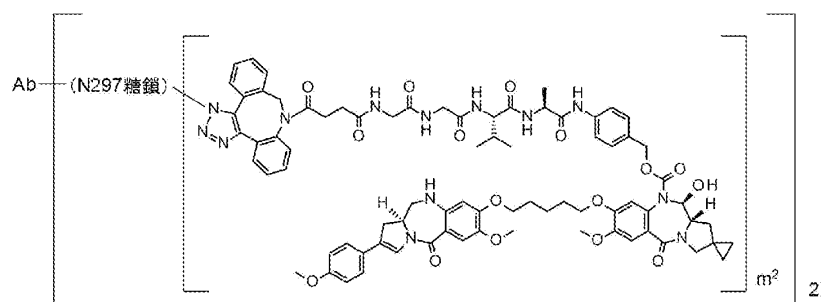
式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 (N 2 9 7) に結合していることを示し、

N 2 9 7 糖鎖中の* - L (P E G) - は、* - (C H ₂ C H ₂ - O)₃ - C H ₂ C H ₂ - N H - であることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖のβ - M a n の分岐鎖の1 - 3 鎖側又は／及び1 - 6 鎖側の非還元末端のシアル酸の2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、* は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1 位又は3 位の窒素原子と結合していることを示す、抗体-薬物コンジュゲート。

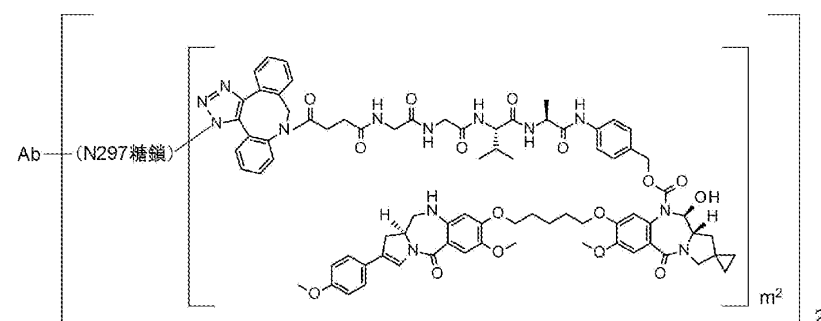
[請求項22] 式 (X I I) で表される化合物が、次の式 (X I I ') :

[化17]



もしくは

(XII')

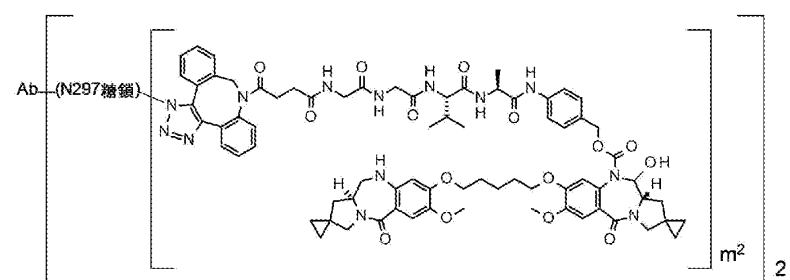


で表される、請求項21に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[請求項23]

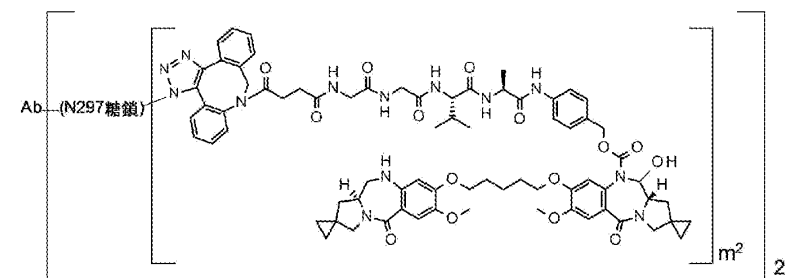
次の式 (XIII) :

[化18]



もしくは

(XIII)



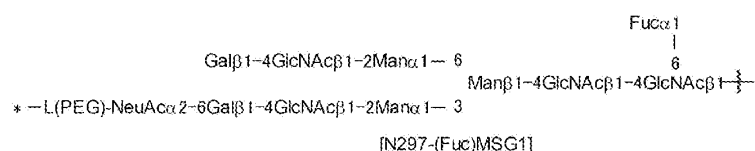
で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

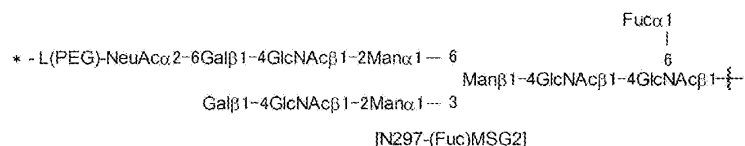
A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

A bのN297糖鎖は次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGのいずれか1つであることを示し、

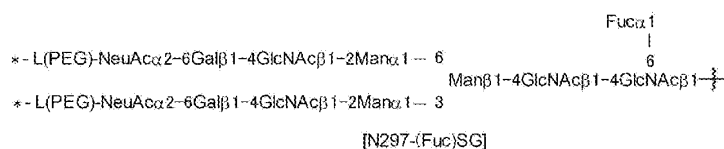
[化19]



[化20]



[化21]



式中、波線は抗体のAsn297(N297)に結合していることを示し、

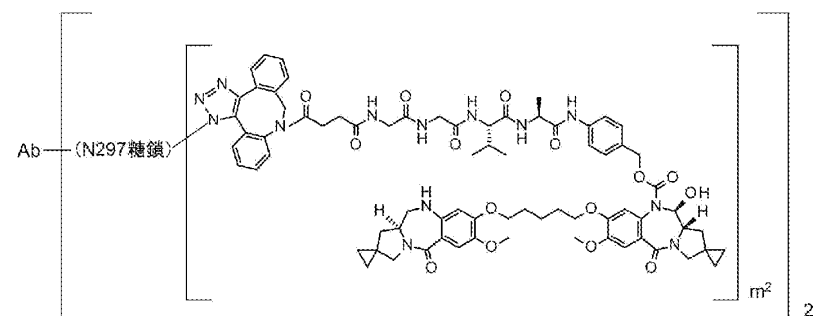
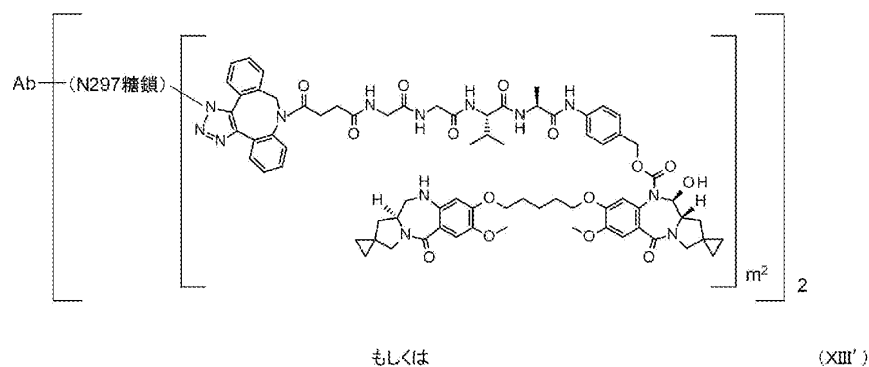
N297糖鎖中の*-L(PEG)-は、*-(CH₂CH₂-O)₃-CH₂CH₂-NH-であることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖のβ-Manの分岐鎖の1-3鎖側又は／及び1-6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカル

ボン酸とアミド結合していることを示し、*は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す、抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項24] 式(XIII)で表される化合物が、次の式(XIII'):

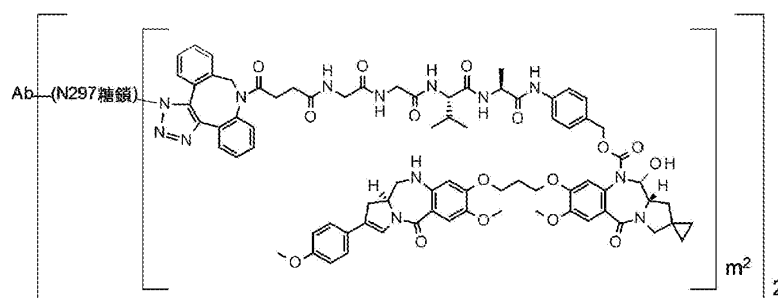
[化22]



で表される、請求項23に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

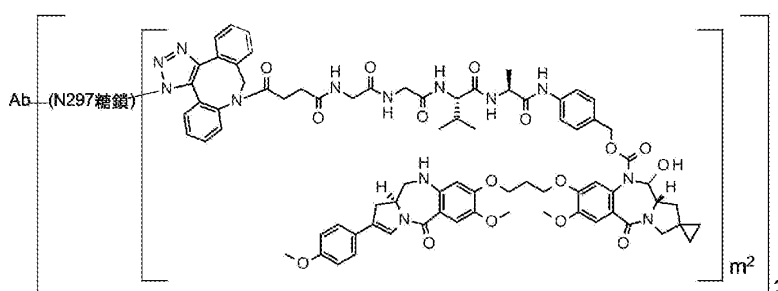
[請求項25] 次の式(XIV):

[化23]



もしくは

(XIV)



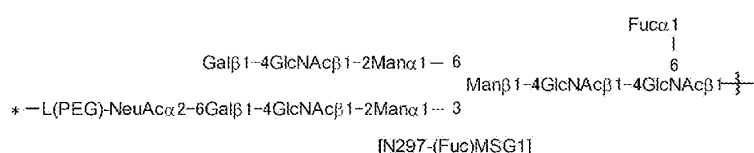
で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

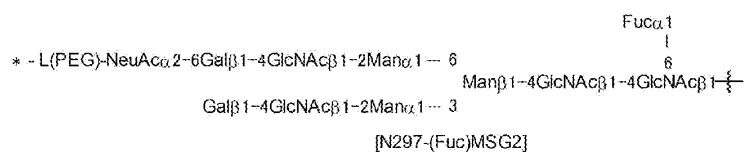
A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

A bのN 2 9 7糖鎖は次式で示される構造を有するN 2 9 7-(F u c) M S G 1、N 2 9 7-(F u c) M S G 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7-(F u c) S Gのいずれか1つであることを示し、

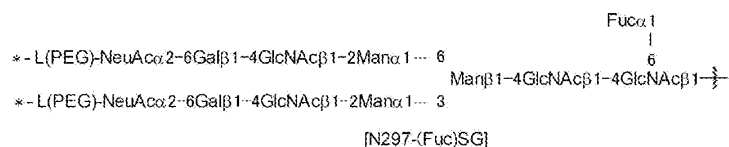
[化24]



[化25]



[化26]



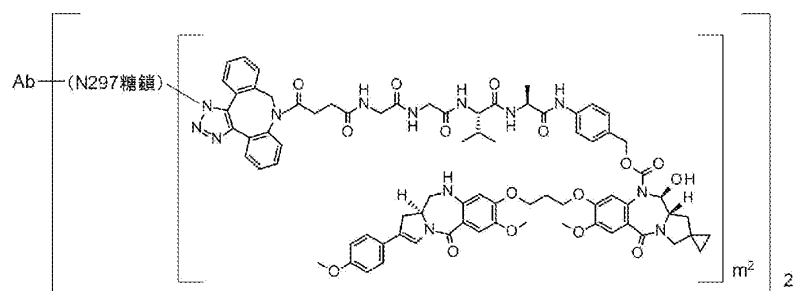
式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 (N 2 9 7) に結合していることを示し、

N 2 9 7 糖鎖中の* - L (P E G) - は、* - (C H ₂ C H ₂ - O)₃ - C H ₂ C H ₂ - N H - でであることを示し、

ここで、右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖のβ - M a n の分岐鎖の1 - 3 鎖側又は／及び1 - 6 鎖側の非還元末端のシアル酸の2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、* は、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1 位又は3 位の窒素原子と結合していることを示す、抗体-薬物コンジュゲート。

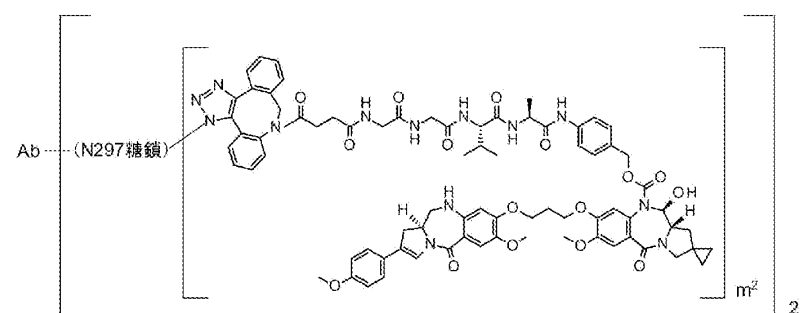
[請求項26] 式 (X I V) で表される化合物が、次の式 (X I V ') :

[化27]



もしくは

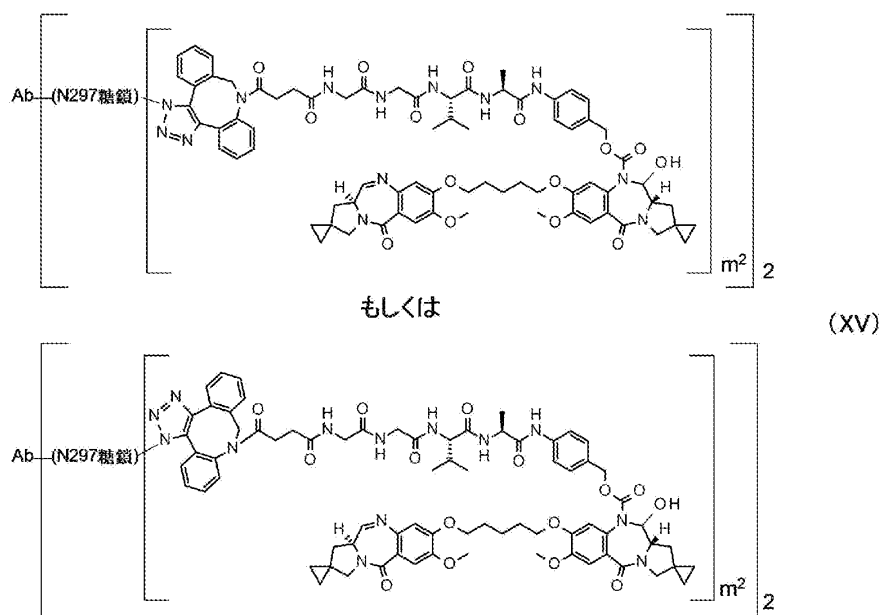
(XIV⁹)



で表される、請求項 25 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔請求項27〕 次の式（X V）：

[化28]



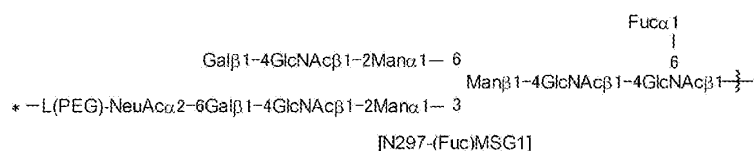
で表される抗体-薬物コンジュゲートであって、ここで、

上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2の整数であることを示し、

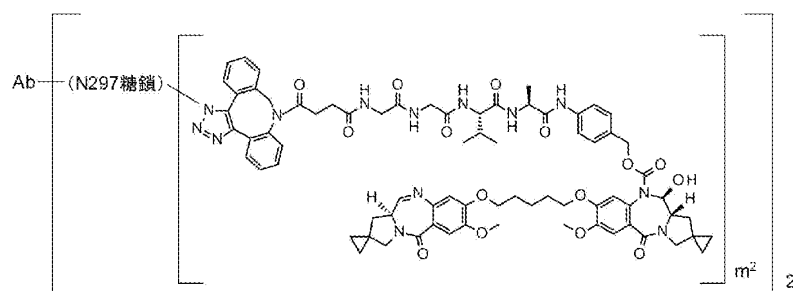
A bは配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、I g G抗体又は当該抗体の機能性断片を示し、

A bのN 2 9 7糖鎖は次式で示される構造を有するN 2 9 7- (F u c) M S G 1、N 2 9 7- (F u c) M S G 2もしくはそれらの混合物、又はN 2 9 7- (F u c) S Gのいずれか1つであることを示し、

[化29]

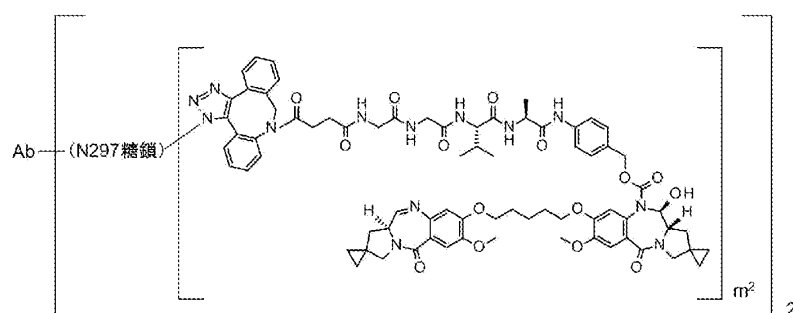


[化32]



もしくは

(XV')



で表される、請求項 27 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項29]

前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の(1)～(4)：

(1) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3、及び、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 18 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 19 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3、

(2) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3、及び、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 19 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3、

(3) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3、及び、配列番号 5 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 5 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3、及び

(4) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3、及び、配列番号 6 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 6 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 6 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3、

からなる群から選択される C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3、及び、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 を含む、

請求項 2 1 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項 30] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の (1) ～ (6) :

(1) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(2) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(3) 配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(4) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 4 9 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(5) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 5 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、又は

(6) 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び

配列番号 60 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、
のいずれかの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域、
を含む、請求項 21～29 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項31] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、以下の (1)～(7)：

- (1) 配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 39 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
- (2) 配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 43 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
- (3) 配列番号 35 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 43 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
- (4) 配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 47 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
- (5) 配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 65 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
- (6) 配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 67 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
又は
- (7) 配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖、
のいずれかを有する、請求項 21～30 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項32] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 39 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項33] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 43 の 20～471 番

目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

- [請求項34] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 35 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 43 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項35] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 47 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項36] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 65 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項37] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 67 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項38] 前記抗体又は当該抗体の機能性断片が、配列番号 31 の 21～233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 69 の 20～471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 31 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項39] 抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体 1 分子あたりの平均薬物結合数が、1～3 である、請求項 1～38 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項40] 抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体 1 分子あたりの平均薬物結合数が、3～5 である、請求項 1～38 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

- [請求項41] 重鎖がN-結合への糖鎖付加、O-結合への糖鎖付加、N末のプロセッシング、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、N末にメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化及びカルボキシル末端において1つ又は2つのアミノ酸が欠失した重鎖からなる群より選択される1又は2以上の修飾を含む抗体である、請求項1～40のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
- [請求項42] 重鎖のカルボキシル末端のリジン残基が欠失した、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
- [請求項43] 以下の工程：
- i) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列に特異的に結合し、細胞内に取り込まれる内在化能を有する、IgG抗体又は当該抗体の機能性断片を製造する工程、
 - ii) 工程i) で得られた抗体を加水分解酵素で処理し、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を製造する工程、及び、
 - iii)-1 MSG(9)又はSG(10)のシアル酸の2位のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有するPEGリンカーを導入し、還元末端をオキサゾリン化して得た糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を反応させる工程、又は、
 - iii)-2 α -アミノ基が保護されていてもよい(MSG-)Asn又は(SG-)Asnのシアル酸の2位のカルボン酸のカルボニル基及び前記Asnのカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有するPEGリンカーを導入し、加水分解酵素を作用させた後、還元末端をオキサゾリン化して得た糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を反応させる工程、を含む、糖鎖リモデリング抗体の製造方法。
- [請求項44] 請求項43に記載の方法により得られた糖鎖リモデリング抗体とドラ

- ッグリンカーを反応させる工程を含む、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。
- [請求項45] 請求項 4 4 に記載の方法で製造された、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。
- [請求項46] 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域、及び、配列番号 5 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 5 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域を含む、抗体又はその機能性断片。
- [請求項47] 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2 及び配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖可変領域、及び、配列番号 6 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 6 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2 及び配列番号 6 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖可変領域を含む、抗体又はその機能性断片。
- [請求項48] 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 5 5 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、請求項 4 6 に記載の抗体又はその機能性断片。
- [請求項49] 配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域及び配列番号 6 0 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む、請求項 4 7 に記載の抗体又はその機能性断片。
- [請求項50] 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 6 7 の 2 0 ～ 4 7 1 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 4 6 又は 4 8 に記載の抗体又はその機能性断片。
- [請求項51] 配列番号 3 1 の 2 1 ～ 2 3 3 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配

- 列番号 69 の 20 ～ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、請求項 47 又は 49 に記載の抗体又はその機能性断片。
- [請求項52] 配列番号 31 の 21 ～ 233 番目のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 65 の 20 ～ 471 番目のアミノ酸配列からなる重鎖を有する、抗体又はその機能性断片。
- [請求項53] 請求項 46 ～ 52 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項54] 請求項 53 に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。
- [請求項55] 請求項 54 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。
- [請求項56] 請求項 55 に記載の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、請求項 46 ～ 52 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の製造方法。
- [請求項57] 請求項 56 に記載の製造方法により得られる、抗体又は該抗体の機能性断片。
- [請求項58] 請求項 1 ～ 42 若しくは 45 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、又は、請求項 46 ～ 52 若しくは 57 のいずれか 1 項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片を含む、医薬組成物。
- [請求項59] 抗腫瘍薬である、請求項 58 に記載の医薬組成物。
- [請求項60] 腫瘍が CDH6 が発現している腫瘍である、請求項 59 に記載の医薬組成物。
- [請求項61] 腫瘍が腎細胞癌、腎臓明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫である、請求項 60 に記載の医薬組成物。
- [請求項62] 請求項 1 ～ 42 若しくは 45 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、請求項 46 ～ 52 若しくは 57 のいずれか 1 項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片、又は、請求項 58 ～ 61 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を個体に投与する工程を含む、腫瘍の治療方法

。

- [請求項63] 腫瘍がC D H 6が発現している腫瘍である、請求項6 2に記載の治療方法。
- [請求項64] 腫瘍が、腎細胞癌、腎淡明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、卵巣癌、卵巣漿液性腺癌、甲状腺癌、胆管癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠芽腫、中皮腫、子宮癌、膵臓癌、ウィルムス腫瘍又は神経芽腫である、請求項6 2又は6 3に記載の治療方法。
- [請求項65] 請求項1～4 2若しくは4 5のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、請求項4 6～5 2若しくは5 7のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片、又は、請求項5 8～6 1のいずれか1項に記載の医薬組成物と少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与する工程を含む、請求項6 2～6 4のいずれか1項に記載の治療方法。