

明 細 書

発明の名称：抗体－薬物コンジュゲートの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、薬物の結合位置が異なる抗体－薬物コンジュゲートの各異性体を一定の比率で含む抗体－薬物コンジュゲート組成物を安定的に製造する方法に関する。

背景技術

[0002] がん細胞表面に発現する抗原に結合し、かつ細胞に内在化できる抗体に、細胞毒性を有する薬物を結合させた抗体－薬物コンジュゲート（Antibody-Drug Conjugate；ADC）は、がん細胞に選択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1～5）。

[0003] 抗体には4つの鎖間ジスルフィドが存在し、その他のジスルフィドよりも溶媒に接近しやすいために還元されやすく、抗体－薬物コンジュゲートにおける薬物（または薬物リンカー）との結合部位とすることができる。抗体の鎖間ジスルフィドを還元し、生じたチオール基に薬物を結合させることにより、抗体1分子当たり最大8個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲートが作製される。

[0004] 抗体1分子当たり8個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲートは、抗腫瘍効果に優れていても、安全性面での認容性が低い場合がある。そこで治療有効性を維持したまま安全性面での認容性を向上させるために、平均薬物結合数が8よりも少ない抗体－薬物コンジュゲートを用いる場合がある。平均薬物結合数が8よりも少ない抗体－薬物コンジュゲートは、例えば、抗体1分子当たりの薬物の量を制御して反応させるなどして得ることができるが、その反応生成物は、薬物結合数が2、4、6および8の抗体－薬物コンジュゲートの組成物である。したがって、平均薬物結合数が同じ抗体－薬物コンジュゲート組成物であっても、各薬物結合数の分布が異なると、治療有効

性および安全性面での認容性も異なってくる可能性がある。例えば、平均薬物結合数が約4の抗体－薬物コンジュゲート組成物において、薬物結合数が0および8の抗体－薬物コンジュゲートの含有率が高い場合は、薬物結合数が4の抗体－薬物コンジュゲートの含有率が高い場合と比較すると、治療有効性が低下し、かつ安全性面での認容性が低下することもありうる。また、同じ薬物結合数の抗体－薬物コンジュゲートであっても、薬物の結合位置の違いにより、治療有効性および安全性面での認容性が異なることもありうる。したがって、抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造においては、薬物の結合数および結合位置が制御された抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造方法が求められる。

- [0005] 薬物の結合数および結合位置が制御された、抗体－薬物コンジュゲート組成物を製造する方法としては、抗体の鎖間ジスルフィドを一旦完全に還元し、生成させた鎖間チオールの一部を再酸化してジスルフィドに戻し、残りの鎖間チオールに薬物を結合させることにより、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートを選択的に作製する方法（特許文献1）や、抗体の鎖間ジスルフィドを低温で還元し、生じた鎖間チオールに薬物を結合させることにより、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートを選択的に作製する方法（特許文献2）が知られている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第2005/084390号

特許文献2：国際公開第2017/002776号

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.
非特許文献2：Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.
非特許文献3：Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452

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

非特許文献5: Howard A. et al., J Clin Oncol 29: 398-405.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 薬物の結合位置が異なる抗体-薬物コンジュゲートの各異性体のうち、特定の異性体を高い比率で含む抗体-薬物コンジュゲート組成物を製造する方法は知られている（国際公開第2005/084390号及び国際公開第2017/002776号）。しかし、工業的な観点では、特定の異性体を高い比率で含むことよりも、各異性体を一定の比率で含む抗体-薬物コンジュゲート組成物を安定的に製造する方法が求められる場合がある。このような抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造方法は知られておらず、工業的に優れた製造方法の開発が求められている。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討したところ、抗体を還元剤と反応させ、チオール基を有する抗体を得る工程を長時間かけて行うことにより、重鎖-軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖-重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達すること（以下、「還元反応の平衡化」とも言う）を見出した。そして、このように得られたチオール基を有する抗体と薬物リンカー中間体とを反応させることにより、薬物の結合位置が異なる抗体-薬物コンジュゲートの各異性体を一定の比率で含む抗体-薬物コンジュゲート組成物を安定的に製造できることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、以下の[1]～[56]を提供する。

[1]

(i) 抗体を還元剤と反応させ、チオール基を有する抗体を得る工程；次いで、

(i) (i) で得られたチオール基を有する抗体を、薬物リンカー中間体と反応させる工程；を含む、抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造方法であって、

(i) の工程が、重鎖－軽鎖間チオールを 4 つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを 4 つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するまで行われることを特徴とする、製造方法。

[2]

(i) の工程が、4 時間以上かけて行われる、[1] に記載の製造方法。

[3]

(i) の工程が、12 時間以上かけて行われる、[1] に記載の製造方法。

[4]

(i) の工程が、16 時間以上かけて行われる、[1] に記載の製造方法。

[5]

(i) の工程が、20 時間以上かけて行われる、[1] に記載の製造方法。

[6]

(i) の工程が、31 時間以上かけて行われる、[1] に記載の製造方法。

[7]

(i) の工程が、0～20℃で行われる、[1]～[6] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[8]

(i) の工程が、5～20℃で行われる、[1]～[6] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[9]

(i) の工程が、5～10℃で行われる、[1]～[6] のいずれか 1 項

に記載の製造方法。

[1 0]

(i) の工程が、約 1 0 ° C で行われる、[1] ～ [6] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[1 1]

製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、平均薬物結合数が 3 . 5 ～ 4 . 5 である、[1] ～ [1 0] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[1 2]

製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、薬物リンカーが 4 個結合した抗体－薬物コンジュゲートの含有率が、5 0 % 以上である、[1] ～ [1 1] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[1 3]

製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが 4 個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比が、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが 4 個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比の 1 . 5 ～ 2 . 5 倍である、[1] ～ [1 2] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[1 4]

還元剤が抗体一分子あたり 1 . 9 ～ 2 . 5 当量で用いられる、[1] ～ [1 3] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[1 5]

還元剤がトリス（ 2 －カルボキシエチル）ホスフィンまたはその塩である、[1] ～ [1 4] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

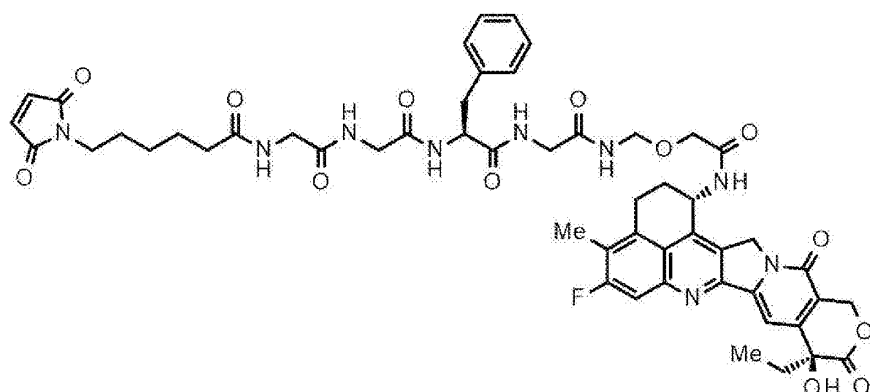
[1 6]

薬物リンカー中間体が、N－置換マレイミジル基を有する、[1] ～ [1 5] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[1 7]

薬物リンカー中間体が、式

[0011] [化1]

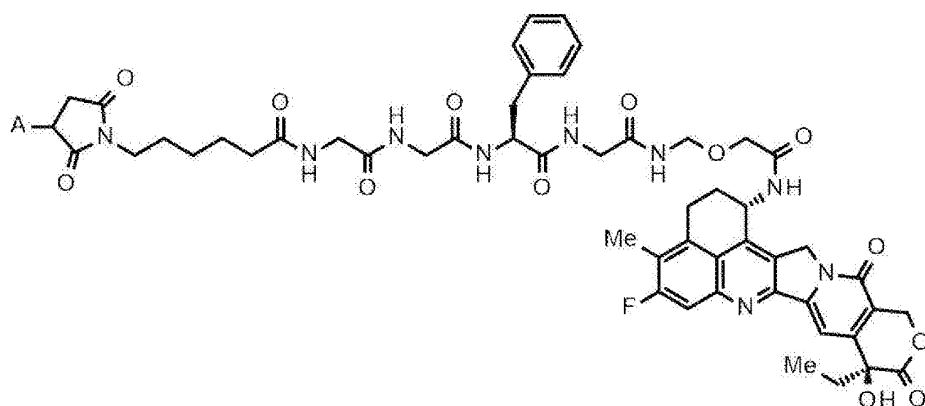


[0012] で示される化合物である、[1]～[15]のいずれか1項に記載の製造方法。

[18]

製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、薬物リンカーが、式

[0013] [化2]



[0014] (式中、Aは抗体との結合位置を示し、該薬物リンカーは抗体とチオエーテル結合によって結合している)

で示される、[17]に記載の製造方法。

[19]

抗体が、抗TRO2抗体、又は抗B7-H3抗体である、[1]～[18]のいずれか1項に記載の製造方法。

[20]

抗体が、抗 T R O P 2 抗体である、[1 9] に記載の製造方法。

[2 1]

抗 T R O P 2 抗体が、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 6 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 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖、並びに、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 9 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 0 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[2 0] に記載の製造方法。

[2 2]

抗 T R O P 2 抗体が、配列番号 1 においてアミノ酸番号 2 0 乃至 1 4 0 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号 2 においてアミノ酸番号 2 1 乃至 1 2 9 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[2 0] に記載の製造方法。

[2 3]

抗 T R O P 2 抗体が、配列番号 1 においてアミノ酸番号 2 0 乃至 4 7 0 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 2 においてアミノ酸番号 2 1 乃至 2 3 4 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、[2 0] に記載の製造方法。

[2 4]

抗 T R O P 2 抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、[2 3] に記載の製造方法。

[2 5]

抗体が、抗 B 7 - H 3 抗体である、[1 9] に記載の製造方法。

[2 6]

抗 B 7 - H 3 抗体が、配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 1 2 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 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖、並びに、配列

番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 15 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 16 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[25] に記載の製造方法。

[27]

抗 B 7-H 3 抗体が、配列番号 3 においてアミノ酸番号 20 乃至 141 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 21 乃至 128 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[25] に記載の製造方法。

[28]

抗 B 7-H 3 抗体が、配列番号 3 においてアミノ酸番号 20 乃至 471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 21 乃至 233 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、[25] に記載の製造方法。

[29]

抗 B 7-H 3 抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、[28] に記載の製造方法。

[30]

[1] ~ [29] のいずれか 1 項に記載の製造方法によって製造される、抗体-薬物コンジュゲート組成物。

[31]

(i) 抗体を還元剤と反応させ、チオール基を有する抗体を得る工程；次いで、

(ii) (i) で得られたチオール基を有する抗体を、薬物リンカー中間体と反応させる工程；を含む、抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造方法であって、

(i) の工程が、0 ~ 20℃で4時間以上かけて行われ、製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物における、薬物リンカーが4個

結合した抗体－薬物コンジュゲートの含有率が、50%以上であり、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比が、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比の1.5～2.5倍であることを特徴とする、製造方法。

[32]

(i)の工程が、12時間以上かけて行われる、[31]に記載の製造方法。

[33]

(i)の工程が、16時間以上かけて行われる、[31]に記載の製造方法。

[34]

(i)の工程が、20時間以上かけて行われる、[31]に記載の製造方法。

[35]

(i)の工程が、31時間以上かけて行われる、[31]に記載の製造方法。

[36]

(i)の工程が、5～20℃で行われる、[31]～[35]のいずれか1項に記載の製造方法。

[37]

(i)の工程が、5～10℃で行われる、[31]～[35]のいずれか1項に記載の製造方法。

[38]

(i)の工程が、約10℃で行われる、[31]～[35]のいずれか1項に記載の製造方法。

[39]

製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、平均薬物結合数が3.5

～4. 5である、[3 1] ～ [3 8] のいずれか1項に記載の製造方法。

[4 0]

還元剤が抗体一分子あたり 1.9～2.5 当量で用いられる、[31]～[39] のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[4 1]

還元剤がトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンまたはその塩である、〔３１〕～〔４０〕のいずれか１項に記載の製造方法。

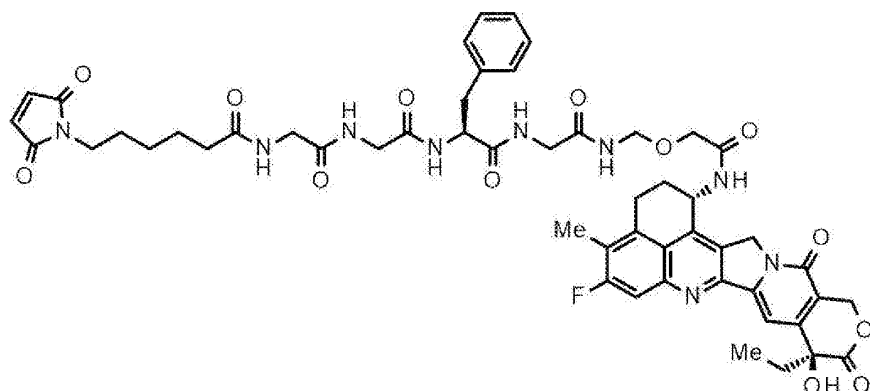
[4 2]

薬物リンカー中間体が、N-置換マレイミジル基を有する、[31]～[41]のいずれか1項に記載の製造方法。

[4 3]

薬物リンカー中間体が、式

[0015] [化3]



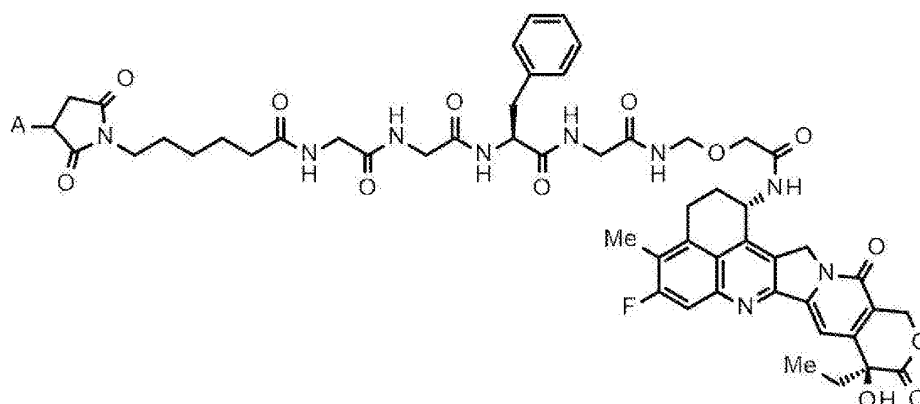
〔0016〕で示される化合物である、〔3 1〕～〔4 1〕のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[4 4]

製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物の、薬物リンカーが、式

[0017]

[化4]



[0018] (式中、Aは抗体との結合位置を示し、該薬物リンカーは抗体とチオエーテル結合によって結合している)

で示される、[43]に記載の製造方法。

[45]

抗体が、抗TRO P 2抗体、又は抗B 7-H 3抗体である、[31]～[44]のいずれか1項に記載の製造方法。

[46]

抗体が、抗TRO P 2抗体である、[45]に記載の製造方法。

[47]

抗TRO P 2抗体が、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRH 1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRH 2、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるCDRH 3を含む重鎖、並びに、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるCDRL 1、配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRL 2、及び配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRL 3を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[46]に記載の製造方法。

[48]

抗TRO P 2抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域

域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[46]に記載の製造方法。

[49]

抗TROP2抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、[46]に記載の製造方法。

[50]

抗TROP2抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、[49]に記載の製造方法。

[51]

抗体が、抗B7-H3抗体である、[45]に記載の製造方法。

[52]

抗B7-H3抗体が、配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖、並びに、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号16に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[51]に記載の製造方法。

[53]

抗B7-H3抗体が、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至141に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至128に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、[51]に記載の製造方法。

[54]

抗B7-H3抗体が、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、[

51]に記載の製造方法。

[55]

抗B7-H3抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、[54]に記載の製造方法。

[56]

[31]～[55]のいずれか1項に記載の製造方法によって製造される、抗体-薬物コンジュゲート組成物。

発明の効果

[0019] 本発明により、薬物の結合位置が異なる抗体-薬物コンジュゲートの各異性体を一定の比率で含む抗体-薬物コンジュゲート組成物を安定的に製造する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]抗TRO P2抗体重鎖のアミノ酸配列（配列番号1）を示した図である。

。

[図2]抗TRO P2抗体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号2）を示した図である。

。

[図3]抗B7-H3抗体重鎖のアミノ酸配列（配列番号3）を示した図である。

。

[図4]抗B7-H3抗体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号4）を示した図である。

。

[図5]抗TRO P2抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造における、D0～D8中のD4の含有率の経時変化を示した図である。

[図6]抗TRO P2抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造における、D4中のD4-1、D4-2の構成比の経時変化を示した図である。

[図7]抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造における、D0～D8中のD4の含有率の経時変化を示した図である。

[図8]抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造における、D4中のD4-1、D4-2の構成比の経時変化を示した図である。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これによって本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0022] 1. 抗体－薬物コンジュゲート

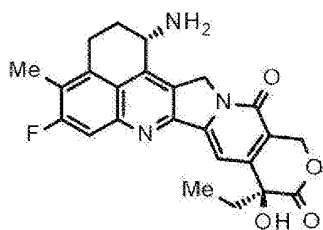
本発明において、「抗体－薬物コンジュゲート」とは、抗体に、細胞毒性を有する薬物を、リンカーを介して結合させた複合体のことを示す。抗体－薬物コンジュゲートとしては、例えば、米国特許第6214345号、国際公開第2002/083067号、国際公開第2003/026577号、国際公開第2004/054622号、国際公開第2005/112919号、国際公開第2006/135371号、国際公開第2007112193号、国際公開第2008/033891号、国際公開第2009/100194号、国際公開第2009/134976号、国際公開第2009/134977号、国際公開第2010/093395号、国際公開第2011/130613号、国際公開第2011/130616号、国際公開第2013/055993号、国際公開第2014/057687号、国際公開第2014/107024号、国際公開第2014/134457号、国際公開第2014/145090号、及び国際公開第2015/098099号に記載のものを挙げることができ、好適には、国際公開第2014/057687号、及び国際公開第2015/098099号に記載のものを挙げることができる。

[0023] 細胞毒性を有する薬物としては、抗腫瘍効果を有し、リンカーに結合できる置換基や部分構造を有するものであれば特に制限はないが、例えば、カンプトテシン (Camptothecin)、カリチアマイシン (Calicheamicin)、ドキソルビシン (Doxorubicin)、ダウノルビシン (Daunorubicin)、マイトマイシンC (Mitomycin C)、ブレオマイシン (Bleomycin)、シクロシチジン (Cyclocytidine)、ビンクリスチン (Vincristine)

）、ビンブラスチン (Vinblastine)、メトトレキサート (Methotrexate)、シスプラチン (Cisplatin)、アウリスチンE (Auristatin E)、メイタンシン (Maytansine)、パクリタキセル (Paclitaxel)、ピロロベンゾジアゼピン (Pyrrolobenzodiazepine)、及びこれらの誘導体を挙げることができ、好適には、カンプトテシン誘導体を挙げることができ、より好適には、エキサテカン (Exatecan) 誘導体を挙げることができる。

[0024] トポイソメラーゼⅠ阻害剤であるエキサテカン (IUPAC名：(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 1, 2, 3, 9, 12, 15 - ヘキサヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 10H, 13H - ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 10, 13 - ジオン、(化学名：(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンとして表すこともできる)) は、式

[0025] [化5]



[0026] で表される化合物である。

[0027] 本発明において、「薬物リンカー」とは、抗体-薬物コンジュゲートにおける薬物とリンカー部分、言い換えれば、抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体以外の部分構造を示す。

[0028] 本発明において、「鎖間ジスルフィド」とは、抗体における2個の重鎖の間のジスルフィド (重鎖-重鎖間ジスルフィド)、または重鎖と軽鎖との間

のジスルフィド（重鎖－軽鎖間ジスルフィド）をいう。

[0029] 本発明において、「鎖間チオール」とは、抗体の鎖間ジスルフィドの還元によって得られるチオール基をいう。

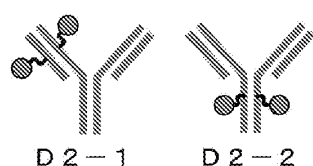
[0030] 本発明において、「重鎖－重鎖間チオール」とは、抗体の重鎖－重鎖間ジスルフィドの還元によって得られるチオール基をいう。

[0031] 本発明において、「重鎖－軽鎖間チオール」とは、抗体の重鎖－軽鎖間ジスルフィドの還元によって得られるチオール基をいう。

[0032] 抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗体 1 分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体には 4 つの鎖間ジスルフィドが存在し、ジスルフィドは 2 つのチオール基から構成されるため、抗体 1 分子への薬物の結合数は、2 個、4 個、6 個、または 8 個となる。

[0033] 抗体 1 分子当たり 2 個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲート（以下、「D 2」と呼ぶこともある。）としては、2 種の異性体、すなわち、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが 2 個結合した抗体－薬物コンジュゲート（以下、「D 2－1」と呼ぶこともある。）、および、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが 2 個結合した抗体－薬物コンジュゲート（以下、「D 2－2」と呼ぶこともある。）が生じ得る。

[0034] [化6]

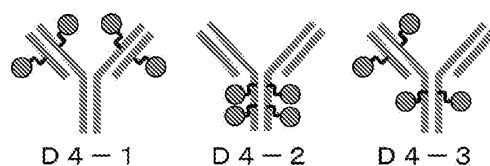


[0035] （式中、長い棒線（折れ線）は重鎖を示し、短い棒線は軽鎖を示し、丸と波線からなるものは薬物リンカーを示す）

抗体 1 分子当たり 4 個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲート（以下、「D 4」と呼ぶこともある。）としては、3 種の異性体、すなわち、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが 4 個結合した抗体－薬物コンジュゲート

(以下、「D 4 - 1」と呼ぶこともある。)、重鎖-重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体-薬物コンジュゲート(以下、「D 4 - 2」と呼ぶこともある。)、および、重鎖-軽鎖間チオールに薬物リンカーが2個結合し重鎖-重鎖間チオールに薬物リンカーが2個結合した抗体-薬物コンジュゲート(以下、「D 4 - 3」と呼ぶこともある。))が生じ得る。

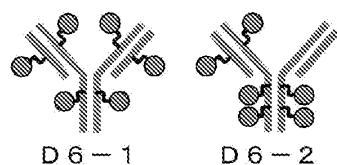
[0036] [化7]



[0037] (式中、長い棒線(折れ線)は重鎖を示し、短い棒線は軽鎖を示し、丸と波線からなるものは薬物リンカーを示す)

抗体1分子当たり6個の薬物が結合した抗体-薬物コンジュゲート(以下、「D 6」と呼ぶこともある。))としては、2種の異性体、すなわち、重鎖-軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合し重鎖-重鎖間チオールに薬物リンカーが2個結合した抗体-薬物コンジュゲート(以下、「D 6 - 1」と呼ぶこともある。)、および、重鎖-軽鎖間チオールに薬物リンカーが2個結合し重鎖-重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体-薬物コンジュゲート(以下、「D 6 - 2」と呼ぶこともある。))が生じ得る。

[0038] [化8]

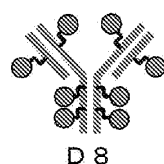


[0039] (式中、長い棒線(折れ線)は重鎖を示し、短い棒線は軽鎖を示し、丸と

波線からなるものは薬物リンカーを示す)

抗体 1 分子当たり 8 個の薬物が結合した抗体－薬物コンジュゲート（以下、「D 8」と呼ぶこともある。）としては、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが 4 個結合し重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが 4 個結合した抗体－薬物コンジュゲートが生じ得る。

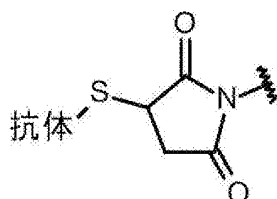
[0040] [化9]



[0041] (式中、長い棒線（折れ線）は重鎖を示し、短い棒線は軽鎖を示し、丸と波線からなるものは薬物リンカーを示す)

抗体の鎖間チオールは、例えば、薬物リンカー中間体の N－置換マレイミジル基の 3 位と、チオエーテルを形成して結合する。すなわち、抗体と薬物リンカーの結合部分は、例えば、次式：

[0042] [化10]



[0043] (式中、「抗体－S－」は抗体由来である。)で示される。

[0044] 本発明において、「抗体－薬物コンジュゲート組成物」とは、D 2、D 4、D 6、D 8、および、薬物リンカーが結合していない抗体（以下、「D 0」と呼ぶこともある。）を任意の割合で含み得る組成物を意味する。

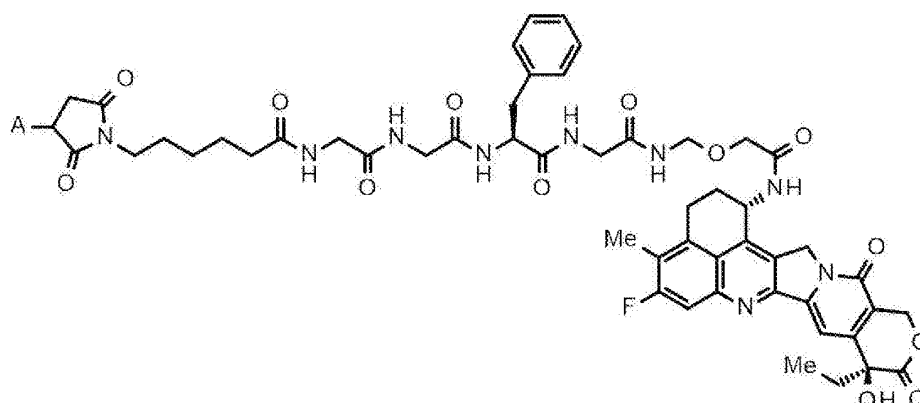
[0045] 本発明において、「平均薬物結合数」とは、薬物抗体比 (Drug to Antibody Ratio (DAR)) とも呼ばれ、抗体－薬物コンジュゲート組成物における、抗体 1 分子に対して結合する薬物（又は薬物リ

ンカー)の平均数を意味する。

[0046] 本発明において、抗体－薬物コンジュゲート組成物における各異性体の「含有率」は、抗体を基準としたモル%で表される。

[0047] 本発明において好適に製造される抗体－薬物コンジュゲートは、式

[0048] [化11]

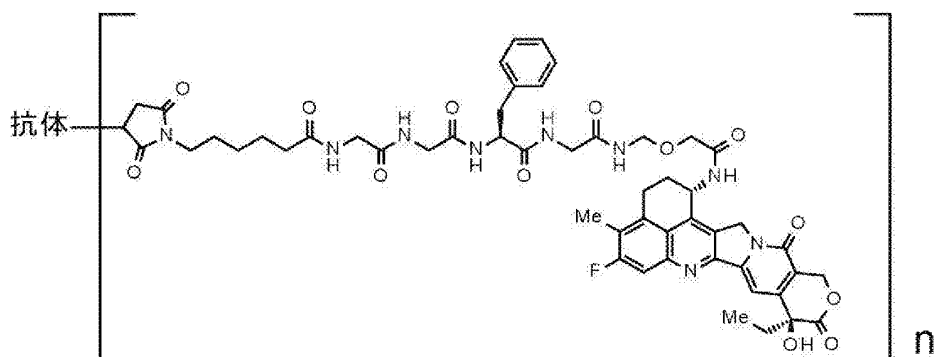


[0049] (式中、Aは抗体との結合位置を示す)

で示される薬物リンカーと、抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗体－薬物コンジュゲートである。この薬物リンカーは、抗体の鎖間のジスルフィド結合部位(2箇所の重鎖－重鎖間、及び2箇所の重鎖－軽鎖間)において生じたチオール基(言い換えれば、システイン残基の硫黄原子)に結合している。

[0050] 本発明において好適に製造される、上記の抗体－薬物コンジュゲートは、次式で示すこともできる。

[0051] [化12]

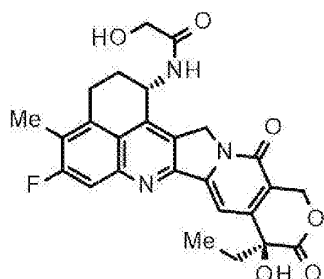


[0052] ここで、薬物リンカーは抗体とチオエーテル結合によって結合している。

また、 n はいわゆる平均薬物結合数（DAR；Drug-to-Antibody Ratio）と同義であり、1抗体あたりの薬物リンカーの平均結合数を示す。

[0053] 本発明において好適に製造される、上記の抗体－薬物コンジュゲートは、がん細胞内に移行した後に、式

[0054] [化13]

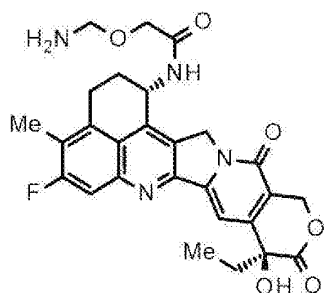


[0055] で表される化合物を遊離することにより、抗腫瘍効果を発揮する。

[0056] 上記化合物は、本発明において好適に製造される、上記の抗体－薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性の本体であると考えられている（国際公開第2014/057687号、及び国際公開第2015/098099号）。

[0057] 上記化合物は、上記の抗体－薬物コンジュゲートのリンカー部分が切断されることにより生じると考えられる、式

[0058] [化14]



[0059] で表される化合物のアミナル構造が分解することにより生じると考えられる。

[0060] 2. 抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される抗体

本発明の抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好適には、ヒト、ラット、マウス、及びウサギに由来する抗体である。抗体がヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

[0061] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される抗体は、好適にはがん細胞を標的にできる性質を有するものであり、がん細胞を認識できる特性、がん細胞に結合できる特性、がん細胞内に取り込まれて内在化する特性、及び／又はがん細胞に対する殺細胞活性等を備えているものが好ましい。

[0062] 抗体のがん細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。がん細胞内への抗体の取り込みは、例えば（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M a b－Z A P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、ジフテリア毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合蛋白質も使用可能である。

[0063] 抗体の抗腫瘍活性は、i n v i t r oでは、細胞の増殖の抑制活性を測定することで確認できる。例えば、抗体の標的蛋白質を過剰発現しているがん細胞株を培養し、培養系に種々の濃度で抗体を添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。i n v i v oでは、例えば、標的蛋白質を高発現しているがん細胞株を移植したヌードマウスに抗体を投与し、がん細胞の変化を測定することに

よって、抗腫瘍活性を確認できる。

[0064] 抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、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、抗体自体の抗腫瘍効果は必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞障害性をがん細胞において特異的・選択的に発揮させる目的からは、抗体ががん細胞内に移行（内在化）する性質のあることが重要であり、好ましい。

[0065] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される抗体は、公知の手段によって取得することができる。例えば、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

[0066] また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p.495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[0067] なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、或は抗原を発現している細胞株、を動物に免疫する方法を用いることによっても抗体を取得できる。

[0068] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される抗体は、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（H

umanized) 抗体であることが好ましく、又はヒト由来の抗体の遺伝子配列のみを有する抗体、すなわちヒト抗体であることが好ましい。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。

- [0069] 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))。
- [0070] ヒト化抗体としては、異種抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体 (Nature(1986) 321, p.522-525)、CDR移植法によって、異種抗体のCDRの配列に加えて、異種抗体の一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体 (国際公開第90/07861号)、遺伝子変換突然変異誘発 (gene conversion mutagenesis) ストラテジーを用いてヒト化した抗体 (米国特許第5821337号) を挙げることができる。
- [0071] ヒト抗体としては、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て作成した抗体 (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。) を挙げることができる。或いは、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により取得した抗体 (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。) も挙げることができる。

[0072] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される抗体には、抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明に係る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－結合炭水化物鎖への化学部分の結合を有する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－結合型糖鎖の付加、アミノ末端又はカルボキシル末端のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化等）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アミノ末端にメチオニン残基が付加されたもの等が含まれる。また、本発明に係る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体の意味に含まれる。この様な本発明に係る抗体の修飾体は、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。

[0073] また、本発明に係る抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際公開第99/54342号、国際公開第00/61739号、国際公開第02/31140号等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明に係る抗体には当該糖鎖修飾が調節された抗体も含まれる。

[0074] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体では、その重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Journal of Chromatography A, 705: 129-134(1995)）、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Analytical Biochemistry, 360: 75-83(2007)）。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等）には影響を及ぼさない。したがって、本発明に係る抗体には、当該修

飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において1又は2のアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよい、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、本発明に係る抗体は、好ましくは2本の重鎖の双方でカルボキシル末端のひとつのアミノ酸残基が欠失しているものを挙げることができる。

[0075] 本発明に係る抗体のアイソタイプとしては、例えばIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）等を挙げることができるが、好ましくはIgG1又はIgG2を挙げることができる。

[0076] 本発明の抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造に使用できる抗体は、特に制限はないが、例えば、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗CD3抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD37抗体、抗CD56抗体、抗CD98抗体、抗DR5抗体、抗EGFR抗体、抗EPHA2抗体、抗FGFR2抗体、抗FGFR4抗体、抗FOLR1抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD70抗体、抗PSMA抗体、抗CEA抗体、抗Mesothelin抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗Cripto抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GPNMB抗体、抗Integrin抗体、抗Tenascin-C抗体、抗SLC44A4抗体、抗GPR20抗体、及び抗CDH6抗体を挙げることができ、好適には、抗TROP2抗体、及び抗B7-H3抗体を挙げることができる。

[0077] 本発明において、「抗TROP2抗体」とは、TROP2（TACSTD2：Tumor-associated calcium signal

t r a n s d u c e r 2 ; E G P - 1) に特異的に結合し、好ましくは、T R O P 2 と結合することによってT R O P 2 発現細胞に内在化する活性を有する抗体を示す。

[0078] 抗T R O P 2 抗体としては、例えば、国際公開第2 0 1 5 / 0 9 8 0 9 9 号に記載の抗体を挙げることができ、

好適には、配列番号5に記載のアミノ酸配列（配列番号1においてアミノ酸番号5 0 乃至5 4 に記載のアミノ酸配列）からなるC D R H 1、配列番号6に記載のアミノ酸配列（配列番号1においてアミノ酸番号6 9 乃至8 5 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7に記載のアミノ酸配列（配列番号1においてアミノ酸番号1 1 8 乃至1 2 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、並びに、配列番号8に記載のアミノ酸配列（配列番号2においてアミノ酸番号4 4 乃至5 4 に記載のアミノ酸配列）からなるC D R L 1、配列番号9に記載のアミノ酸配列（配列番号2においてアミノ酸番号7 0 乃至7 6 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 0 に記載のアミノ酸配列（配列番号2においてアミノ酸番号1 0 9 乃至1 1 7 に記載のアミノ酸配列）からなるC D R L 3を含む軽鎖、を含んでなる抗体を挙げることができ、

より好適には、配列番号1においてアミノ酸番号2 0 乃至1 4 0 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号2 1 乃至1 2 9 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体を挙げることができ、

更により好適には、配列番号1においてアミノ酸番号2 0 乃至4 7 0 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号2 1 乃至2 3 4 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は、該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体を挙げることができる。

[0079] 本発明において、「抗B 7 - H 3 抗体」とは、B 7 - H 3 (B c e l l a n t i g e n # 7 h o m o l o g 3 ; P D - L 3 ; C D 2 7

6) に特異的に結合し、好ましくは、B 7-H 3 と結合することによって B 7-H 3 発現細胞に内在化する活性を有する抗体を示す。

[0080] 抗 B 7-H 3 抗体としては、例えば、M 3 0-H 1-L 4 (国際公開第 2 0 1 4 / 0 5 7 6 8 7 号) を挙げることができ、

好適には、配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列 (配列番号 3 においてアミノ酸番号 5 0 乃至 5 4 に記載のアミノ酸配列) からなる C D R H 1、配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列 (配列番号 3 においてアミノ酸番号 6 9 乃至 8 5 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 3 に記載のアミノ酸配列 (配列番号 3 においてアミノ酸番号 1 1 8 乃至 1 3 0 に記載のアミノ酸配列) からなる C D R H 3 を含む重鎖、並びに、配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列 (配列番号 4 においてアミノ酸番号 4 4 乃至 5 3 に記載のアミノ酸配列) からなる C D R L 1、配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列 (配列番号 4 においてアミノ酸番号 6 9 乃至 7 5 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 6 に記載のアミノ酸配列 (配列番号 4 においてアミノ酸番号 1 0 8 乃至 1 1 6 に記載のアミノ酸配列) からなる C D R L 3 を含む軽鎖、を含んでなる抗体を挙げることができ、

より好適には、配列番号 3 においてアミノ酸番号 2 0 乃至 1 4 1 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 2 1 乃至 1 2 8 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体を挙げることができ、

更により好適には、配列番号 3 においてアミノ酸番号 2 0 乃至 4 7 1 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 2 1 乃至 2 3 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は、該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体を挙げることができる。

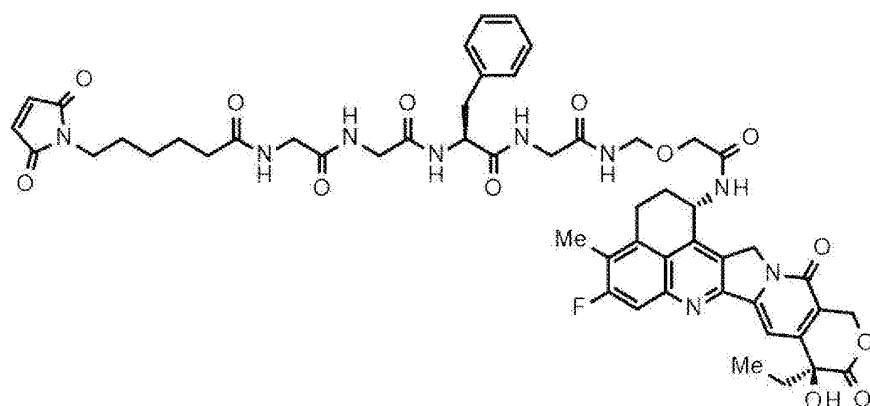
[0081] 本発明において、「抗 T R O P 2 抗体-薬物コンジュゲート組成物」とは、本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物における抗体が抗 T R O P 2 抗体である抗体-薬物コンジュゲート組成物を示す。

[0082] 本発明において、「抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物」とは、本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物における抗体が抗B7-H3抗体である抗体-薬物コンジュゲート組成物を示す。

[0083] 3. 抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造に使用される薬物リンカー中間体

本発明の抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造に用いられる薬物リンカー中間体は、抗体の鎖間チオールとの反応に供される化合物であれば特に限定されないが、好適には、N-置換マレイミジル基を有する化合物であり、より好適には、次式で示される化合物である。

[0084] [化15]



[0085] 上記の薬物リンカー中間体は、N-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-2-オキソエトキシ)メチル]グリシンアミド、という化学名で表すことができ、国際公開第2014/057687号、国際公開第2015/098099号、及び国際公開第2019/044947号等の記載を参考に製造することができる。

[0086] 4. 抗体と薬物リンカー中間体のコンジュゲーション

本発明において、抗体と薬物リンカー中間体のコンジュゲーションは、

(i) 抗体を還元剤と反応させ、チオール基を有する抗体を得る工程；次いで、

(ii) (i) で得られたチオール基を有する抗体を、薬物リンカー中間体と反応させる工程；を含み、

(i) の工程は、重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するまで行われること（還元反応の平衡化）を特徴とする。これにより、薬物の結合位置が異なる各抗体－薬物コンジュゲートの異性体を一定の比率で含む抗体－薬物コンジュゲート組成物を安定的に製造することができる。

[0087] 本発明において「定常値に達する」とは、経時に伴い構成比(%)が一定の値（実質的に一定の値と認識できる範囲で変動しても良く、好適には±5%の範囲で変動しても良く、より好適には±4%の範囲で変動しても良く、更により好適には±3%の範囲で変動しても良く、更により好適には±2%の範囲で変動しても良く、更により好適には±1%の範囲で変動しても良い）を示すようになることを意味する。

[0088] なお、各反応時間における重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比は、該反応時間をかけて製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物におけるD4－1の構成比（D4－1の含有率／（D4－1の含有率＋D4－2の含有率）×100）と同一と考えることができる。

[0089] また、各反応時間における重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比は、該反応時間をかけて製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物におけるD4－2の構成比（D4－2の含有率／（D4－1の含有率＋D4－2の含有率）×100）と同一と考えることができる。

[0090] 従って、重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達する時間は、例えば、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物におけるD4－1及びD4－

2の各構成比の経時変化を追跡し、これらが一定の値（実質的に一定の値と認識できる範囲で変動しても良く、好適には±5%の範囲で変動しても良く、より好適には±4%の範囲で変動しても良く、更により好適には±3%の範囲で変動しても良く、更により好適には±2%の範囲で変動しても良く、更により好適には±1%の範囲で変動しても良い）となる時間を確認することにより、特定することができる。

[0091] (i)の工程は、好適には、2時間以上かけて行うことができ、より好適には、4時間以上、12時間以上、16時間以上、20時間以上、又は31時間以上かけて行うことができ、更により好適には、5時間以上、12時間以上、20時間以上、24時間以上、又は48時間以上かけて行うことができ、更により好適には、6時間以上、12時間以上、20時間以上、24時間以上（又は36時間以上）、又は48時間以上かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、2時間～168時間かけて行うことができ、より好適には、4時間～50時間、12時間～48時間、16時間～48時間、20時間～51時間、又は31時間～50時間かけて行うことができ、更により好適には、5時間～50時間、12時間～48時間、20時間～51時間、24時間～48時間、又は48時間～50時間かけて行うことができ、更により好適には、6時間～50時間、12時間～48時間、20時間～51時間、24時間～48時間（又は36時間～48時間）、又は48時間～50時間かけて行うことができる。

[0092] (i)の工程は、好適には、-5℃～35℃で行うことができ、より好適には、0～20℃で行うことができ、更により好適には、5～20℃で行うことができ、更により好適には、5～10℃、又は約10℃で行うことができる。本発明において、「約10℃」とは、好適には、8℃～12℃であり、より好適には、9℃～11℃であり、更により好適には、10℃～11℃、又は10℃である。

[0093] (i)の工程が20℃で行われる場合、(i)の工程は、好適には、4時間以上かけて行うことができ、より好適には、5時間以上かけて行うことが

でき、更により好適には、6時間以上かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、4時間～50時間かけて行うことができ、より好適には、5時間～50時間かけて行うことができ、更により好適には、6時間～50時間かけて行うことができる。

[0094] (i)の工程が10℃で行われる場合、(i)の工程は、好適には、12時間以上、又は20時間以上かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、12時間～48時間、又は20時間～51時間かけて行うことができる。

[0095] (i)の工程が5℃で行われる場合、(i)の工程は、好適には、16時間以上かけて行うことができ、より好適には、20時間以上かけて行うことができ、更により好適には、24時間以上（又は36時間以上）かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、16時間～48時間かけて行うことができ、より好適には、20時間～48時間かけて行うことができ、更により好適には、24時間～48時間（又は36時間～48時間）かけて行うことができる。

[0096] (i)の工程が0℃で行われる場合、(i)の工程は、好適には、31時間以上かけて行うことができ、より好適には、48時間以上かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、31時間～50時間かけて行うことができ、より好適には、48時間～50時間かけて行うことができる。

[0097] (i)の工程の反応時間と反応温度は、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体の種類に応じて、更に最適化することができる。

[0098] すなわち、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗TROP2抗体（好適には、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体）である場合、(i)の工程は、好適には、約10℃で20時間以上かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、約10℃で20時間～51時間か

けて行うことができる。

- [0099] また、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗B7－H3抗体（好適には、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体）である場合、（i）の工程は、好適には、5～10℃（より好適には、6℃、7℃、8℃、9℃、又は10℃）で12時間以上、又は5℃で20時間以上かけて行うことができ、上限値を含む形では、好適には、5～10℃（より好適には、6℃、7℃、8℃、9℃、又は10℃）で12時間～48時間、又は5℃で20時間～48時間かけて行うことができる。
- [0100] （i）の工程で使用される還元剤は、抗体の鎖間ジスルフィドを還元できるものであれば特に限定されないが、例えば、トリス（2－カルボキシエチル）ホスフィン若しくはその塩、ジチオトレイトール、又は2－メルカプトエタノールを用いることができ、好適には、トリス（2－カルボキシエチル）ホスフィン若しくはその塩を用いることができ、より好適には、トリス（2－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩を用いることができる。
- [0101] （i）の工程で使用される還元剤の抗体1分子あたりの当量（以下、本発明において「当量」とは、モル当量を意味する。）は、好適には、抗体1分子に対して1.9～2.5当量用いることができ、より好適には、抗体1分子に対して2～2.2当量用いることができる。
- [0102] （i）の工程で用いられる溶媒は、反応が進行するものであれば特に制限はないが、好適には、L－ヒスチジン水溶液を用いることができる。
- [0103] （i）の工程で用いられる溶媒は、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体の種類に応じて、更に最適化することができる。
- [0104] すなわち、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗TROP2抗体（好適には、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番

号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体)である場合、(i)の工程で用いられる溶媒は、好適には、 0.001 mol/L ～ 0.1 mol/L のL-ヒスチジン水溶液であり、より好適には、 0.005 mol/L ～ 0.02 mol/L のL-ヒスチジン水溶液であり、更により好適には、 0.01 mol/L のL-ヒスチジン水溶液である。(i)の工程における反応液のpHは、好適には、リン酸水素二ナトリウム水溶液を用いて調整することができ、該pHは、好適には、 $6.4\sim 7.4$ であり、より好適には、 $6.7\sim 7.1$ であり、更により好適には 6.9 である。

[0105] また、製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗B7-H3抗体(好適には、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体)である場合、(i)の工程で用いられる溶媒は、好適には、 0.005 mol/L ～ 0.3 mol/L のL-ヒスチジン水溶液であり、より好適には、 0.025 mol/L ～ 0.1 mol/L のL-ヒスチジン水溶液であり、更により好適には、 0.05 mol/L のL-ヒスチジン水溶液である。

[0106] なお、(i)の工程における反応液は、抗体製造由来の緩衝液を含有しているもよい。

[0107] (i)の工程は、好適には、キレート剤の存在下で行われる。キレート剤は、抗体の鎖間ジスルフィドの還元の際に使用され得るものであれば特に制限されないが、例えば、エチレンジアミン四酢酸(以下、「EDTA」とも言う)、ジエチレントリアミン五酢酸、又は、グリコールエーテルジアミン四酢酸を用いることができ、好適には、エチレンジアミン四酢酸を用いることができる。

[0108] キレート剤は、好適には、抗体1分子に対して1～20当量用いることができ、より好適には、抗体1分子に対して3～8当量用いることができ、更

により好適には、抗体 1 分子に対して 4 ～ 6 当量用いることができ、更により好適には、抗体 1 分子に対して 5 又は 6 当量用いることができる。

[0109] (i) の工程で使用される緩衝液は、界面活性剤を含有していてもよい。本発明において「界面活性剤」とは、親水性基と疎水性基を有し、医薬品製剤の構成成分の一つとして使用され得る物質を示す。このような界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート（ポリソルベート 80 (Tween 80)、ポリソルベート 20 (Tween 20)、及びポリソルベート 60 (Tween 60) を含む)、ポリオキシエチレン (160) ポリオキシプロピレン (30) グリコール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、ポリオキシエチレンヒマシ油、又はラウリル硫酸ナトリウムを挙げることができる、より好適には、ポリソルベート 20、又はポリソルベート 80 を挙げることができる。

[0110] (i) の工程で使用される界面活性剤の種類は、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の抗体の種類に応じて、適宜選択することができる。

[0111] 例えば、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗 TROP 2 抗体（好適には、配列番号 1 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 2 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体）である場合、(i) の工程で使用される緩衝液は、ポリソルベート 80 を含有し、好適に用いることができる。

[0112] また、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗 B7-H3 抗体（好適には、配列番号 3 においてアミノ酸番号 20 乃至 471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 21 乃至 233 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体）である場合、(i) の工程で使用される緩衝液は、ポリソルベート 20 を含有し、好適に用いることができる。

- [0113] (i i) の工程で用いられる薬物リンカー中間体は、好適には、抗体 1 分子に対して 4 ～ 5 当量用いることができ、より好適には、抗体 1 分子に対して 4.2 ～ 4.6 当量用いることができ、更により好適には、抗体 1 分子に対して 4.4 当量用いることができる。
- [0114] (i i) の工程で用いられる薬物リンカー中間体は、好適には、溶媒に溶解した状態で (i) の工程で得られた反応液に添加することができる。かかる溶媒としては、抗体との結合反応の際に使用され得るものであれば特に制限されないが、好適には、ジメチルスルホキシド、ジメチルスルホキシド水溶液、アセトン、又は、アセトン水溶液を用いることができ、より好適には、ジメチルスルホキシド水溶液を用いることができ、更により好適には、80%ジメチルスルホキシド水溶液を用いることができる。更に、これらの溶媒は、好適には酢酸を含有した状態で用いることができ、より好適には酢酸水溶液を含有した状態で用いることができる。
- [0115] (i i) の工程は、好適には、0 ～ 20℃で行うことができ、より好適には、5 ～ 20℃で行うことができ、更により好適には、5 ～ 10℃、又は約 10℃で行うことができる。
- [0116] (i i) の工程の反応時間は、好適には、20 分間～4 時間であり、より好適には 0.5 ～ 2 時間である。
- [0117] (i i) の工程の後、余剰の薬物リンカー中間体をクエンチさせるためにチオール基を有する試薬を用いることができる。
- [0118] チオール基を有する試薬としては、薬物リンカー中間体のマレイミジル基と反応できるものであれば特に制限されないが、例えば、N-アセチルシステイン、及びシステインを用いることができ、好適には、N-アセチルシステインを用いることができる。
- [0119] チオール基を有する試薬は、好適には、2 ～ 8 当量用いることができ、より好適には、3 ～ 7 当量用いることができ、更により好適には 3 ～ 5 当量用いることができる。
- [0120] チオール基を有する試薬を添加する工程は、好適には、0 ～ 20℃で行う

ことができ、より好適には、5～20℃で行うことができ、更により好適には、5～10℃、又は約10℃で行うことができる。

[0121] 得られた抗体-薬物コンジュゲート組成物は、限外濾過により、薬物リンカー中間体由来の不純物を除去し精製することができる。

[0122] 本発明において「限外濾過」とは、約0.001μmから約0.05μmの範囲の細孔径をもつ膜（限外濾過膜）を通して濾過することにより、大きな溶質分子と小さい溶質分子とを、又は溶質分子と溶媒分子とを分別する精製方法を意味する。限外濾過膜は一般に1kDa～1000kDaの範囲の分子量のカットオフ（MWCO）を有する。MWCOは、一般にその膜により90%保持される球状の溶質の分子量として定義される。本発明の限外濾過は、好適にはMWCOが1kDa～100kDaの限外濾過膜を用いて行うことができ、より好適には30kDaの限外濾過膜を用いて行うことができる。また、限外濾過膜の材質としては、例えば、再生セルロース、酢酸セルロース、芳香族ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ナイロン、及びセラミックを挙げることができる。本発明の限外濾過は、好適には、再生セルロースを材質とする限外濾過膜を用いて行うことができるが、これに限定されない。本発明で用いる限外濾過膜の例としては、Pellicon（登録商標）XL Cassette Ultracel（登録商標）（メルク社製）、Pellicon（登録商標）2 Ultracel（登録商標）（メルク社製）、及びPellicon（登録商標）3 Ultracel（登録商標）（メルク社製）を挙げることができる。なお、限外濾過は、圧力操作又は遠心操作によって強制的に濾過する方法を特に意味し、一方で、受動拡散によって濾過する方法は「透析濾過」と呼ばれることもあるが、限外濾過膜を使用する方法であれば、いずれの場合も本発明における「限外濾過」に含まれる。

[0123] 本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物の平均薬物結合数は、好適には2～6であり、より好適には3～5であり、更により好適

には3.5～4.5であり、更により好適には、約4である。本発明において「約4」とは、好適には、3.8～4.2であり、より好適には、3.9～4.1であり、更により好適には4である。

[0124] また、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲート（D4）の含有率は、好適には、50%以上であり、上限値を含む形では、好適には、50～59%、50～60%、50～70%、50～80%、50～90%、又は50～100%である。

[0125] さらに、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比は、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比の、好適には、1.5～2.5倍であり、より好適には、1.5～2.33倍である。

[0126] 言い換えれば、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの含有率と、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの含有率との比率は、好適には、60：40～71：29であり、より好適には、60：40～70：30である。

5. 抗体－薬物コンジュゲート組成物の特性評価

製造された抗体－薬物コンジュゲート組成物の抗体一分子あたりの平均薬物結合数の算出は、例えば、280nm及び370nmの二波長における抗体－薬物コンジュゲートとそのコンジュゲーション前駆体のUV吸光度を測定することにより算出する方法（UV法）や、抗体－薬物コンジュゲートを還元剤で処理し得られた各フラグメントをHPLC測定により定量し算出する方法（HPLC法）により行うことができる（国際公開第2014/057687号、国際公開第2015/098099号、及び国際公開第2017/002776号等を参照）。HPLC法は、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体の種類に応じて、測定条件を最適化すること

ができる。

(1-1) 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組成物の希釈溶液(60 μ L)をジチオトレイトール(DTT)水溶液(100 mM、15 μ L)と混合する。混合物を37°Cで20分、又は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鎖間のジスルフィドを切断したサンプルを、HPLC分析に用いる。

[0127] (1-2) HPLC分析

製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗TROP2抗体(好適には、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体)である場合、例えば、以下のように行うことができる。

[0128] 測定装置: 高速液体クロマトグラフ

検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 280 nm)

カラム: PLRP-S (2.1 $\times$ 50 mm、8 μ m、1000 Å; Agilent Technologies)

カラム温度: 80°C

移動相A: 0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液

移動相B: 0.04%TFAを含むアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム(移動相B): 27%–36%(0分–12.5分)、36%–42%(12.5–15分)、42%–27%(15分–15.1分)、27%–27%(15.1分–25分)

[0129] また、製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗B7-H3抗体(好適には、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号2

1乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体)である場合、例えば、以下のように行うことができる。

[0130] 測定装置：高速液体クロマトグラフ

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280nm）

カラム：PLRP-S（2.1×50mm、8μm、1000Å；Agilent Technologies）

カラム温度：80℃

移動相A：0.05%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液

移動相B：0.04%TFAを含むアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム（移動相B）：29%－36%（0分－12.5分）、36%－42%（12.5－15分）、42%－29%（15分－15.1分）、29%－29%（15.1分－25分）

[0131]（1－3）データ解析

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

[0132] 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、軽鎖、重鎖およ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。

[0133] [数1]

軽鎖ピーク面積補正值(A_{Li})

$$= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{軽鎖のモル吸光係数}}{\text{軽鎖のモル吸光係数} + \text{薬物結合数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0134] [数2]

$$\begin{aligned} & \text{重鎖ピーク面積補正值}(A_{Hi}) \\ &= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{重鎖のモル吸光係数}}{\text{重鎖のモル吸光係数} + \text{薬物結合数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}} \end{aligned}$$

[0135] ここで、各抗体における軽鎖および重鎖のモル吸光係数（280 nm）は、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423）によって、各抗体の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。

[0136] 例えば、抗体が、抗TROP2抗体（配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）である場合、軽鎖のモル吸光係数として27640を、重鎖のモル吸光係数として83810を推定値として用いることができる。

[0137] また、抗体が、抗B7-H3抗体（配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）である場合、軽鎖のモル吸光係数として30160を、重鎖のモル吸光係数として87250を推定値として用いることができる。

[0138] 薬物リンカーのモル吸光係数（280 nm）は、各薬物リンカー中間体をメルカプトエタノールまたはN-アセチルシステインで反応させ、マレイミジル基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（280 nm）を用いることができる。

[0139] 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。

[0140]

[数3]

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

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

A_{Li} , A_{Hi} : L_i , H_i 各々のピーク面積補正值

- [0141] 抗体－薬物コンジュゲート組成物における平均薬物結合数を、下式に従って計算する。
- [0142] 平均薬物結合数 = $(L_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + L_1 \text{ピーク面積比} \times 1 + H_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + H_1 \text{ピーク面積比} \times 1 + H_2 \text{ピーク面積比} \times 2 + H_3 \text{ピーク面積比} \times 3) / 100 \times 2$
- [0143] 製造された抗体－薬物コンジュゲート組成物における、薬物の結合数および薬物の結合位置が異なる各異性体の含有率の算出は、例えば、HPLCを用いて各異性体の溶出時間を分離し、各異性体の含有量の面積値を測定する方法により行うことができる（国際公開第2017/002776号等を参照）。HPLC法は、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体の種類に応じて、最適化することができる。
- [0144] (2-1) HPLC分析
- 抗体－薬物コンジュゲート組成物の希釈溶液をHPLC分析に用いる。もしくは希釈溶液を37℃で60分インキュベートしたサンプルを、HPLC分析に用いる。
- [0145] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗TROP2抗体（好適には、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体）である場合、例えば、以下のように行うことができる。

[0146] 測定装置：高速液体クロマトグラフ

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280 nm）

カラム：TSK-gel Butyl-NPR（4.6×35 mm、2.5 μm；東ソー株式会社）

カラム温度：25℃

移動相A：1.5 M硫酸アンモニウムを含む、30 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）

移動相B：30 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を90%、イソプロピルアルコールを10%含む混合溶液

グラジエントプログラム（移動相B）：25%－65%（0分－15分）、65%－95%（15－15.1分）、95%（15.1－18分）、95%－25%（18分－18.1分）、25%（18.1分－25分）

[0147] また、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における抗体が、抗B7-H3抗体（好適には、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体、又は該抗体の重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している抗体）である場合、例えば、以下のように行うことができる。

[0148] 測定装置：高速液体クロマトグラフ

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280 nm）

カラム：TSK-gel Butyl-NPR（4.6×35 mm、2.5 μm；東ソー株式会社）

カラム温度：25℃

移動相A：1.5 M硫酸アンモニウムを含む、30 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）

移動相B：30 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を90%、イソプロピルアルコールを10%含む混合溶液

グラジエントプログラム（移動相B）：20%－64%（0分－15分）

、64%－95%（15－15.1分）、95%（15.1－18分）、95%－20%（18分－18.1分）、20%（18.1分－25分）

[0149] （2－2）データ解析

（2－1）のHPLC分離条件の場合、D0、D2、D4－1、D4－2、D6、D8の順に塩濃度の差により溶出される。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、抗体およ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。

[0150] [数4]

ピーク面積補正值(A_i)

$$= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{抗体のモル吸光係数}}{\text{抗体のモル吸光係数} + \text{薬物結合数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0151] ここで、各抗体における軽鎖および重鎖のモル吸光係数（280nm）は、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423）によって、各抗体のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。

[0152] 例えば、抗体が、抗TROP2抗体（配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）である場合、抗体のモル吸光係数として223400を推定値として用いることができる。

[0153] また、抗体が、抗B7-H3抗体（配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）である場合、抗体のモル吸光係数として235320を推定値として用いることができる。

[0154] 薬物リンカーのモル吸光係数（280nm）は、各薬物リンカー中間体をメルカプトエタノールまたはN-アセチルシステインで反応させ、マレイミジル基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数（280nm）を用いることができる。

[0155] ピーク面積補正值合計に対する各ピーク面積比（％）を下式に従って計算する事により、各異性体の含有率を算出することができる。

[0156] [数5]

$$\text{ピーク面積比} = \frac{A_i}{A_{D0} + A_{D2} + A_{D4-1} + A_{D4-2} + A_{D6} + A_{D8}} \times 100$$

A_i : 各々のピーク面積補正值

[0157] 6. 医薬組成物

本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物は、1種以上の薬学的に適合性の成分を含み投与され得る。薬学的に適合性の成分は、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の投与量や投与濃度等に応じて、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。例えば、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物は、ヒスチジン緩衝剤等の緩衝剤、スクロース又はトレハロース等の賦形剤、並びにポリソルベート80又はポリソルベート20等の界面活性剤を含む医薬組成物として投与され得る。

[0158] 本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、患者に対しては全身療法として適用する他、がん組織に局所的に適用して治療効果を期待することができる。

[0159] 本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、哺乳動物に対して好適に使用することができるが、より好適にはヒトに対して使用することができる。

[0160] 本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、好適には、注射剤として使用することができ、より好適には、水性注射剤又は凍結乾燥注射剤として使用することができ、更により好適には、凍結乾燥注射剤として使用することができる。

[0161] 本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物が水性注射剤である場合、好適には、適切な希釈液で希釈した後、静脈内に点滴投与することができる。希釈液としては、ブドウ糖溶液（好適には

5%ブドウ糖溶液)や、生理食塩液、等を挙げることができる。

[0162] 本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物が凍結乾燥注射剤である場合、好適には、注射用水により溶解した後、必要量を適切な希釈液で希釈した後、静脈内に点滴投与することができる。希釈液としては、ブドウ糖溶液（好適には5%ブドウ糖溶液）や、生理食塩液等を挙げることができる。

[0163] 本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物を投与するために使用され得る導入経路としては、例えば、静脈内、皮内、皮下、筋肉内、及び腹腔内の経路を挙げることができ、好適には、静脈内の経路を挙げることができる。

[0164] 本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物は、ヒトに対して、1~180日間に1回の間隔で投与することができ、好適には、1週、2週、3週、又は4週に1回の間隔で投与することができ、さらにより好適には、3週に1回の間隔で投与することができる。また、本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物は、1回あたり約0.001~100mg/kgの投与量で投与することができ、好適には、1回あたり0.8~12.4mg/kgの投与量で投与することができる。本発明で使用する抗体-薬物コンジュゲート組成物が抗TROP2抗体-薬物コンジュゲート組成物である場合、好適には、1回あたり、0.27mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、6.0mg/kg、又は8.0mg/kgの投与量を3週に1回の間隔で投与することができる。本発明で使用する抗体-薬物コンジュゲート組成物が抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物である場合、好適には、1回あたり、0.8mg/kg、1.6mg/kg、3.2mg/kg、4.8mg/kg、6.4mg/kg、又は8.0mg/kgの投与量を3週に1回の間隔で投与することができる。

[0165] 本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、がんの治療のために使用することができ、好適には、乳がん（トリ

プルネガティブ乳がん、及びルミナル乳がんを含む）、胃がん（胃腺がんと呼ぶこともある）、大腸がん（結腸直腸がんと呼ぶこともあり、結腸がん及び直腸がんを含む）、肺がん（小細胞肺がん及び非小細胞肺がんを含む）、食道がん、頭頸部がん（唾液腺がん及び咽頭がんを含む）、胃食道接合部腺がん、胆道がん（胆管がんを含む）、ページェット病、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん肉腫、尿路上皮がん、前立腺がん、膀胱がん、消化管間質腫瘍、子宮頸がん、扁平上皮がん、腹膜がん、肝臓がん、肝細胞がん、子宮体がん、腎がん、外陰部がん、甲状腺がん、陰茎がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髄腫、多型神経膠芽腫、肉腫、骨肉腫、及びメラノーマからなる群より選択される少なくとも一つのがんの治療のために使用することができる。

[0166] 本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、がん治療の主要な治療法である薬物療法のための薬剤として選択して使用することができ、その結果として、がん細胞の成長を遅らせ、増殖を抑え、さらにはがん細胞を破壊することができる。これらの作用によって、がん患者において、がんによる症状からの解放や、QOLの改善を達成でき、がん患者の生命を保って治療効果が達成される。がん細胞の破壊には至らない場合であっても、がん細胞の増殖の抑制やコントロールによってがん患者においてより高いQOLを達成しつつより長期の生存を達成させることができる。

[0167] このような薬物療法においての薬物単独での使用の他、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、アジュバント療法において他の療法と組み合わせて使用することもでき、外科手術や、放射線療法、ホルモン療法等と組み合わせることができる。さらにはネオアジュバント療法における薬物療法として使用することもできる。

[0168] 以上のような治療的使用の他、本発明によって製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、微細な転移がん細胞の増殖を押さえ、さらには破壊するといった予防効果も期待することができる。例えば、転

移過程で体液中にあるがん細胞を抑制し破壊する効果や、いずれかの組織に着床した直後の微細ながん細胞に対する抑制、破壊等の効果が期待できる。したがって、特に外科的ながんの除去後においてのがん転移の抑制、予防効果が期待できる。

[0169] 本発明によって製造される抗体-薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、他のがん治療剤と併用して投与することもでき、これによって抗腫瘍効果を増強させることができる。この様な目的で使用される他のがん治療剤として、イリノテカン (Irinotecan、CPT-11)、シスプラチン (Cisplatin)、カルボプラチン (Carboplatin)、オキサリプラチン (Oxaliplatin)、フルオロウラシル (Fluorouracil、5-FU)、ゲムシタビン (Gemcitabine)、カペシタビン (Capecitabine)、パクリタキセル (Paclitaxel)、ドセタキセル (Docetaxel)、ドキソルビシン (Doxorubicin)、エピルビシン (Epirubicin)、シクロフォスファミド (Cyclophosphamide)、マイトマイシンC (Mitomycin C)、テガフル (Tegafur)・ギメラシル (Gimeracil)・オテラシル (Oteracil) 配合剤、セツキシマブ (Cetuximab)、パニツムマブ (Panitumumab)、ベバシズマブ (Bevacizumab)、ラムシルマブ (Ramucirumab)、レゴラフェニブ (Regorafenib)、トリフルリジン (Trifluridine)・チピラシル (Tipiracil) 配合剤、ゲフィチニブ (Gefitinib)、エルロチニブ (Erlotinib)、アフアチニブ (Afatinib)、オシメルチニブ (Osimertinib)、メトトレキサート (Methotrexate)、ペメトレキセド (Pemetrexed)、タモキシフェン (Tamoxifen)、トレミフェン (Toremifene)、フルベストラント (Fulvestrant)、リュープロレリン (Leuprorelin)、ゴセレリン (Goserelin)、レトロゾール (Letrozole)

)、アナストロゾール (Anastrozole)、プロゲステロン製剤 (Progesterone formulation)、トラスツズマブエムタンシン (Trastuzumab emtansine)、トラスツズマブ (Trastuzumab)、ペルツズマブ (Pertuzumab)、ラパチニブ (Lapatinib)、ニボルマブ (Nivolumab)、ペムブロリズマブ (Pembrolizumab)、アテゾリズマブ (Atezolizumab)、デュルバルマブ (Durvalumab)、アベルマブ (Avelumab)、イピリムマブ (Ipilimumab)、トレメリムマブ (Tremelimumab)、オラパリブ (Olaparib)、ルカパリブ (Rucaparib)、ニラパリブ (Niraparib)、タラゾパリブ (Talzoparib)、及びベリパリブ (Veliparib) 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。

実施例

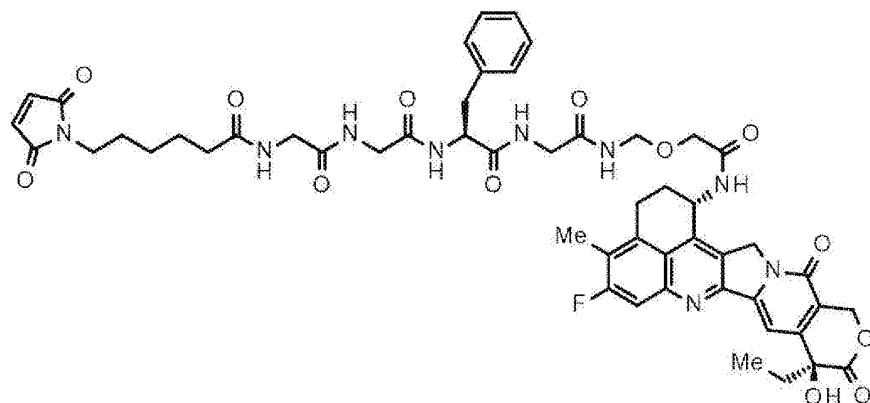
[0170] 以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

[0171] [実施例 1] 抗 TROP2 抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造における D4-1 及び D4-2 の各構成比の経時変化の追跡

抗 TROP2 抗体 (配列番号 1 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 2 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体) を含む溶液 (抗体 500 mg 相当) をポリプロピレンチューブに入れ、更に、0.1 g/g ポリソルベート 80 水溶液 (50 μ L)、0.5 mol/L EDTA 水溶液 (抗体に対し 5 当量)、0.01 mol/L L-ヒスチジン水溶液 (38 mL) を加えたのち、0.3 mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液を加え pH 6.9 に調整した。次いで、0℃、10℃、又は 20℃ 攪拌下で、1 mg/g トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩を含む水溶液 (2.12 g; 抗体一分子に対して 2.15 当量) を加え、同温にて攪

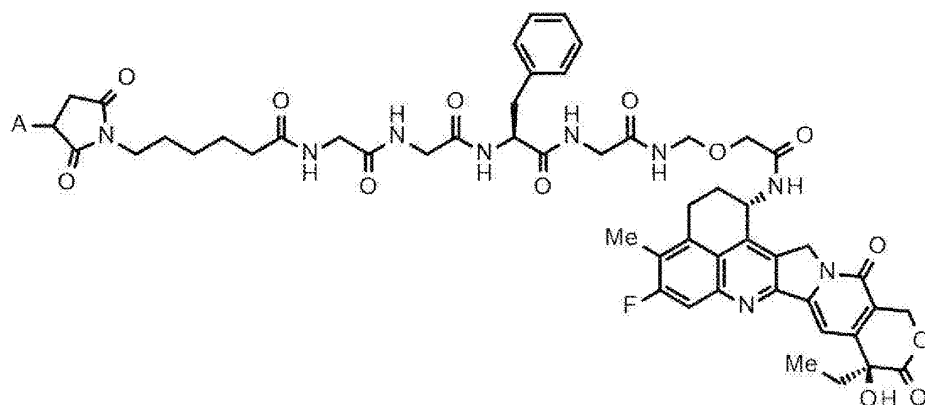
拌することによりチオール基を有する抗体を生じさせた。１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、２０時間、２２時間、２４時間、２５時間、２８時間、３１時間、４４時間、４８時間、５０時間、又は５１時間が経過した時点で本反応液を一部採取したものに対し、式

[0172] [化16]



[0173] で示される化合物を加え、チオール基を有する抗体と反応させた。これにより、式

[0174] [化17]



[0175] (式中、Aは抗体との結合位置を示す)

で示される薬物リンカーと、抗TRO2抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗TRO2抗体-薬物コンジュゲート組成物を得た。

[0176] 得られた抗TRO2抗体-薬物コンジュゲート組成物におけるD0～D8中のD4の含有率、及びD4中のD4-1、D4-2の構成比を測定する

ことにより、反応の経時変化を追跡した。

[0177] 反応温度 0℃の結果を表 1 に示す。

[0178] [表1]

時間	D 4 の 含有率 (%)	構成比 (%)	
		D 4 - 1	D 4 - 2
1	5 0	9 5	5
2	5 5	9 4	6
3	5 6	9 3	7
4	5 9	9 2	8
5	5 8	9 2	8
6	5 8	9 1	9
7	5 9	8 9	1 1
2 2	5 8	7 8	2 2
2 5	5 8	7 7	2 3
3 1	5 8	7 4	2 6
4 8	5 8	7 0	3 0
5 0	5 9	7 0	3 0

[0179] D 4 - 1 の構成比は反応時間が長くなるほど減少し、D 4 - 2 の構成比は反応時間が長くなるほど増加した。そして、反応時間が 3 1 時間以上（好適には 4 8 時間以上）で D 4 - 1 の構成比と D 4 - 2 の構成比が一定の値を示すようになることが確認された。このことから、反応温度 0℃の場合は、3 1 時間以上（好適には 4 8 時間以上）で、重鎖－軽鎖間チオールを 4 つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを 4 つ有する抗体の構成比とが、定常値に達することが確認された。

反応温度 1 0℃の結果を表 2 に示す。

[0180]

[表2]

時間	D 4 の 含有率 (%)	構成比 (%)	
		D 4 - 1	D 4 - 2
1	5 6	9 3	7
2	5 8	8 9	1 1
3	5 8	8 6	1 4
5	5 8	8 0	2 0
6	5 7	7 7	2 3
2 0	5 7	6 6	3 4
2 4	5 7	6 6	3 4
2 8	5 7	6 4	3 6
4 4	5 6	6 5	3 5
5 1	5 5	6 5	3 5

[0181] D 4 - 1 の構成比は反応時間が長くなるほど減少し、D 4 - 2 の構成比は反応時間が長くなるほど増加した。そして、反応時間が20時間以上でD 4 - 1 の構成比とD 4 - 2 の構成比が一定の値を示すようになることが確認された。このことから、反応温度10℃の場合は、20時間以上で、重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達することが確認された。

反応温度20℃の結果を表3に示す。

[0182]

[表3]

時間	D 4 の 含有率 (%)	構成比 (%)	
		D 4 - 1	D 4 - 2
1	5 5	8 4	1 6
2	5 6	7 5	2 5
3	5 5	6 9	3 1
4	5 5	6 6	3 4
5	5 6	6 5	3 5
6	5 5	6 3	3 7
7	5 5	6 3	3 7
2 2	5 4	6 2	3 8
2 5	5 4	6 2	3 8
3 1	5 4	6 2	3 8
4 8	5 2	6 3	3 7
5 0	5 2	6 3	3 7

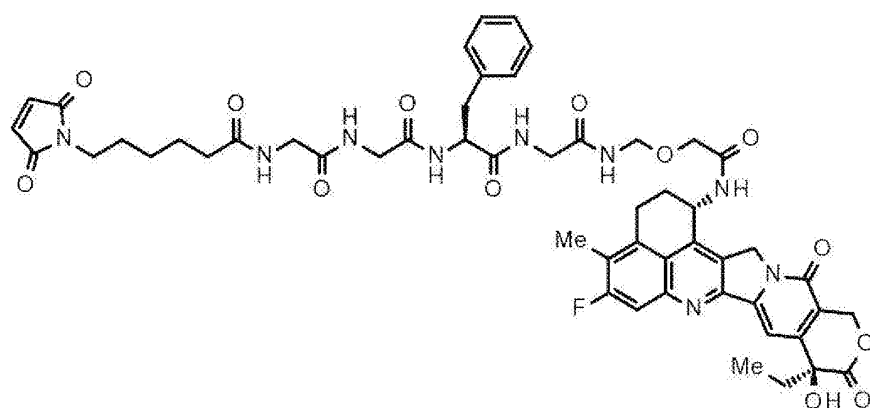
[0183] D 4 の含有率については0℃および10℃の場合よりも若干低く、また反応時間が長くなるにつれ、わずかに減少する傾向が認められた。D 4 - 1 の構成比は反応時間が長くなるほど減少し、D 4 - 2 の構成比は反応時間が長くなるほど増加した。そして、反応時間が4時間以上（好適には5時間以上、より好適には6時間以上）でD 4 - 1 の構成比とD 4 - 2 の構成比が一定の値を示すようになることが確認された。このことから、反応温度20℃の場合は、4時間以上（好適には5時間以上、より好適には6時間以上）で、重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達することが確認された。

反応温度0℃、10℃、及び20℃の結果として、D 0 ～D 8 中のD 4 の含有率の経時変化を図5に、D 4 中のD 4 - 1、D 4 - 2 の構成比の経時変化を図6に示す。

[0184] [実施例2] 抗B 7 - H 3 抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造におけるD 4 - 1 及びD 4 - 2 の各構成比の経時変化の追跡

[0185] 抗B7-H3抗体（配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）を含む溶液（抗体250mg相当）をポリプロピレンチューブに入れ、更に、ポリソルベート20（2.9mg）、0.5mol/L EDTA水溶液（抗体に対し6当量）、0.05mol/L L-ヒスチジン水溶液（12.5mL）を加えた。次いで、5℃、又は10℃攪拌下で、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（1.03mg；抗体一分子に対して2.1当量）を含む水溶液を加え、同温にて振とうすることによりチオール基を有する抗体を生じさせた。1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間、12時間、16時間、20時間、24時間、36時間、又は48時間が経過した時点で本反応液を一部採取したものに対し、式

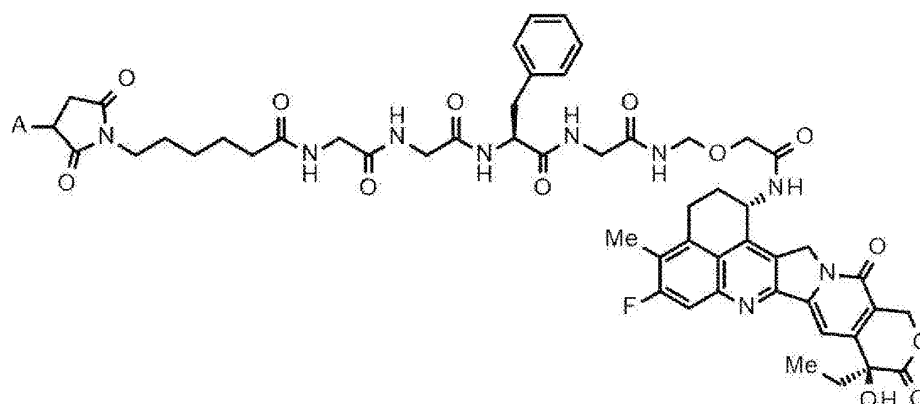
[0186] [化18]



[0187] で示される化合物を加え、チオール基を有する抗体と反応させた。これにより、式

[0188]

[化19]



[0189] (式中、Aは抗体との結合位置を示す)

で示される薬物リンカーと、抗B7-H3抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物を得た。

[0190] 得られた抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物におけるD0～D8中のD4の含有率、及びD4中のD4-1、D4-2の構成比を測定することにより、反応の経時変化を追跡した。

反応温度5℃の結果を表4に示す。

[0191]

[表4]

時間	D 4 の 含有率 (%)	構成比 (%)	
		D 4 - 1	D 4 - 2
1	5 3	9 4	6
2	5 7	9 2	8
3	5 8	8 9	1 1
4	5 8	8 7	1 3
6	5 8	8 2	1 8
8	5 7	7 8	2 2
1 2	5 7	7 3	2 7
1 6	5 6	7 0	3 0
2 0	5 6	6 9	3 1
2 4	5 5	6 8	3 2
3 6	5 4	6 6	3 4
4 8	5 3	6 5	3 5

[0192] D 4 - 1 の構成比は反応時間が長くなるほど減少し、D 4 - 2 の構成比は反応時間が長くなるほど増加した。そして、反応時間が1 6時間以上（好適には2 0時間以上、より好適には2 4時間以上（又は3 6時間以上））でD 4 - 1 の構成比とD 4 - 2 の構成比が一定の値を示すようになることが確認された。このことから、反応温度5℃の場合は、1 6時間以上（好適には2 0時間以上、より好適には2 4時間以上（又は3 6時間以上））で、重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達することが確認された。

反応温度1 0℃の結果を表5に示す。

[0193]

[表5]

時間	D 4 の 含有率 (%)	構成比 (%)	
		D 4 - 1	D 4 - 2
1	5 5	9 1	9
2	5 7	8 7	1 3
3	5 7	8 2	1 8
4	5 6	7 8	2 2
6	5 6	7 3	2 7
8	5 5	7 0	3 0
1 2	5 5	6 5	3 5
1 6	5 5	6 4	3 6
2 0	5 4	6 4	3 6
2 4	5 4	6 3	3 7
3 6	5 2	6 5	3 5
4 8	5 1	6 3	3 7

[0194] D 4 - 1 の構成比は反応時間が長くなるほど減少し、D 4 - 2 の構成比は反応時間が長くなるほど増加した。そして、反応時間が1 2 時間以上でD 4 - 1 の構成比とD 4 - 2 の構成比が一定の値を示すようになることが確認された。このことから、反応温度1 0℃の場合は、1 2 時間以上で、重鎖－軽鎖間チオールを4 つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4 つ有する抗体の構成比とが、定常値に達することが確認された。

[0195] 反応温度5℃、及び1 0℃の結果として、D 0 ～D 8 中のD 4 の含有率の経時変化を図7に、D 4 中のD 4 - 1、D 4 - 2 の構成比の経時変化を図8に示す。

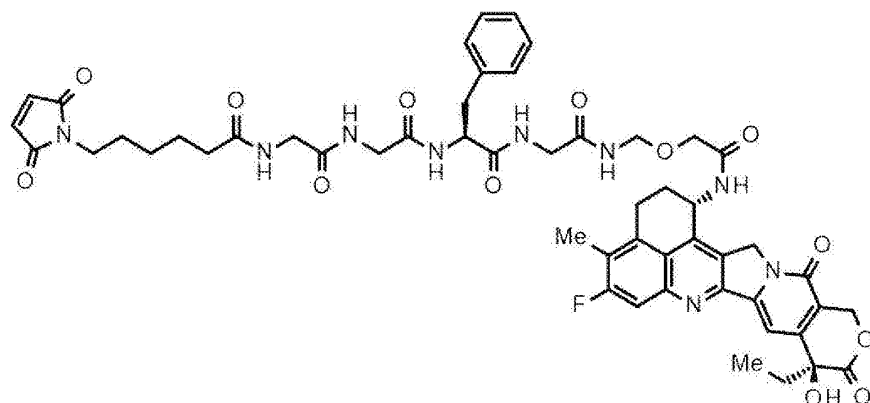
[0196] [実施例3] 本発明の方法による抗T R O P 2 抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造

抗T R O P 2 抗体（配列番号1においてアミノ酸番号2 0乃至4 7 0に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号2 1乃至2 3 4に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）を含む溶液

(液重量 10.4 kg : 抗体 400 g 相当) をシングルユースリアクターに入れ、更に、0.1 g/g ポリソルベート 80 水溶液 (40 mL)、0.5 mol/L EDTA 水溶液 (28 mL ; 抗体に対し 5 当量)、0.01 mol/L L-ヒスチジン水溶液 (30 kg) を加えたのち、0.3 mol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液を加え pH 6.9 に調整した。10~11℃ 攪拌下で、1 mg/g トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩を含む水溶液 (1.70 kg ; 抗体一分子に対して 2.15 当量) を加え還元し、内温 10~11℃ で 30 時間攪拌することにより、重鎖-軽鎖間チオールを 4 つ有する抗体の構成比と、重鎖-重鎖間チオールを 4 つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するようにした。

[0197] 得られた反応液に対し、内温 10℃ にて、攪拌下、式

[0198] [化20]

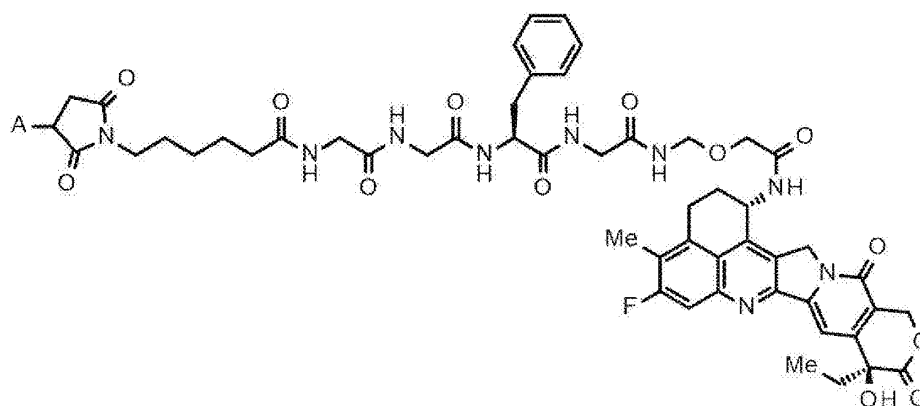


[0199] で示される化合物 (13.4 g ; 抗体一分子に対して 4.4 当量) を、10% 酢酸水溶液 (7.4 mL) と 80% ジメチルスルホキシド水溶液 (1.5 L) の混合物に溶解させたものを 26 分かけて加え、同温度にて 50 分攪拌し、チオール基を有する抗体へ結合させた。次に、0.05 M N-アセチルシステイン水溶液 (0.17 L ; 抗体一分子に対して 3 当量) を加え、さらに同温度にて 1 時間攪拌したのち、10% 酢酸水溶液を用いて、pH を 5 に調整した。

[0200] 得られた溶液を Pellicon (登録商標) 2 Ultracel (登録商標) (メルク社製) を用い、ローラーポンプにて 0.01 mol/L ヒ

スチジン緩衝液（pH 5）を加えながら循環させることにより限外ろ過を行い、化合物由来の不純物を除去した。溶液の濃縮と pH 6 への調整を行い、式

[0201] [化21]



[0202] （式中、Aは抗体との結合位置を示す）

で示される薬物リンカーと、抗TRO P 2抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗TRO P 2抗体－薬物コンジュゲート組成物を含有する溶液を7.00kg得た。

[0203] さらに、上記の溶液に対し、スクロース（1.6kg）を溶解させたpH 6ヒスチジン緩衝液、pH 6ヒスチジン緩衝液、0.1g/Lポリソルベート80水溶液（28g）を添加し、更に9%スクロース含有ヒスチジン緩衝液（pH 6）を加え、タンパク濃度を20g/Lに調整し、抗TRO P 2抗体－薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物（19.0kg）を得た。得られた医薬組成物は、タンパク質濃度：20.3g/L、タンパク質収量：374g、抗体一分子あたりの平均薬物結合数：4.0であった。また、各異性体の含有率は、D0：3%、D2：18%、D4：53%（うち、D4-1：60%、D4-2：40%）、D6：20%、D8：4%であった。

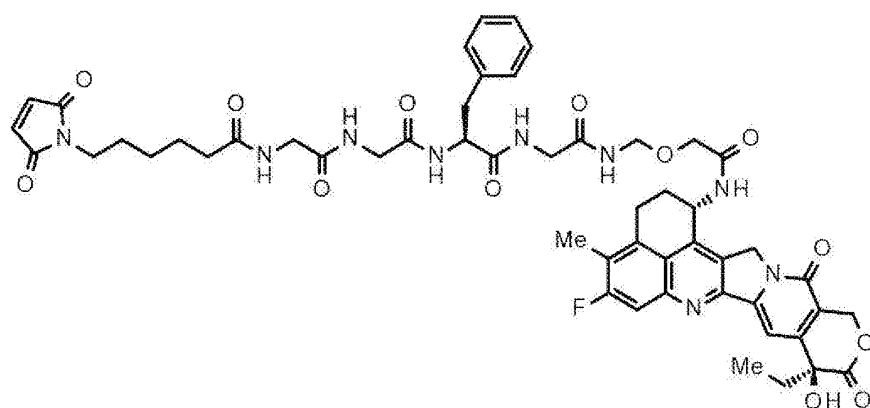
[0204] [実施例4] 本発明の方法による抗B7-H3抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造

抗B7-H3抗体（配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記

載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体)を含む溶液(液重量10.2kg:抗体200g相当)をシングルユースリアクターに入れ、更に、ポリソルベート20(4.6g)、0.5mol/L EDTA水溶液(18g;抗体に対し6当量)、0.05mol/L L-ヒスチジン水溶液(10kg)を加えた。5℃攪拌下で、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(0.831g;抗体一分子に対して2.1当量)を含む水溶液を加え還元し、内温5℃で4時間、10℃で15時間攪拌することにより、重鎖-軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖-重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するようにした。

[0205] 得られた反応液に対し、内温9～11℃にて、攪拌下、式

[0206] [化22]

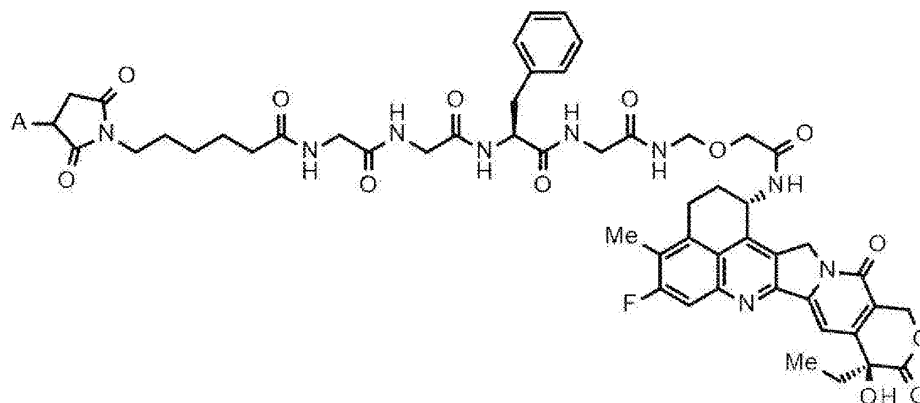


[0207] で示される化合物(6.64g;抗体一分子に対して4.4当量)を、10%酢酸水溶液(3.7mL)を含む80%ジメチルスルホキシド水溶液(1.1kg)にて溶解させたものを50分かけて加え、同温度にて24分攪拌し、チオール基を有する抗体へ結合させた。次に、0.05M N-アセチルスチン水溶液(0.14kg;抗体一分子に対して5当量)を加え、さらに同温度にて1時間攪拌したのち、10%酢酸水溶液を用いて、pHを5に調整した。

[0208] 得られた溶液をPellicon(登録商標)2 Ultracel(登

録商標）（メルク社製）を用い、ローラーポンプにて0.01mol/Lヒスチジン緩衝液（pH5）を加えながら循環させることにより限外ろ過を行い、化合物由来の不純物を除去した。溶液の濃縮とpH5.9への調整を行い、式

[0209] [化23]



[0210] （式中、Aは抗体との結合位置を示す）

で示される薬物リンカーと、抗B7-H3抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物を含有する溶液を6.82kg得た。

[0211] さらに、上記の溶液に対し、スクロース（0.83kg）を溶解させたpH5.9ヒスチジン緩衝液、およびpH5.9ヒスチジン緩衝液を添加し、更に9%スクロース含有ヒスチジン緩衝液（pH5.9）を加え、タンパク濃度を20g/Lに調整し、抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物（10.1kg）を得た。得られた医薬組成物は、タンパク質濃度：20.4g/L、タンパク質収量：198g、抗体一分子あたりの平均薬物結合数：4.0であった。また、各異性体の含有率は、D0：3%、D2：20%、D4：54%（うち、D4-1：64%、D4-2：36%）、D6：18%、D8：5%であった。

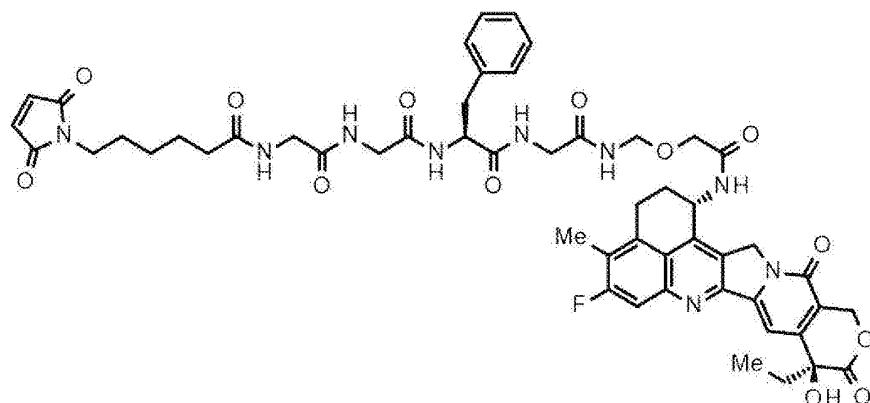
[0212] [実施例5] 本発明の方法による抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造

抗B7-H3抗体（配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記

載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体)を含む溶液(液重量51.0g:抗体1.0g相当)にポリソルベート20の100mg/g水溶液(0.23mL)、0.5mol/L EDTA水溶液(抗体に対し6当量)、0.05mol/L L-ヒスチジン水溶液(50mL)を加えた。5℃攪拌下で、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(4.50mg;抗体一分子に対して2.3当量)を含む水溶液を加え還元し、内温5℃で24時間攪拌することにより、重鎖-軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖-重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するようにした。

[0213] 得られた反応液に対し、内温4～6℃にて、攪拌下、式

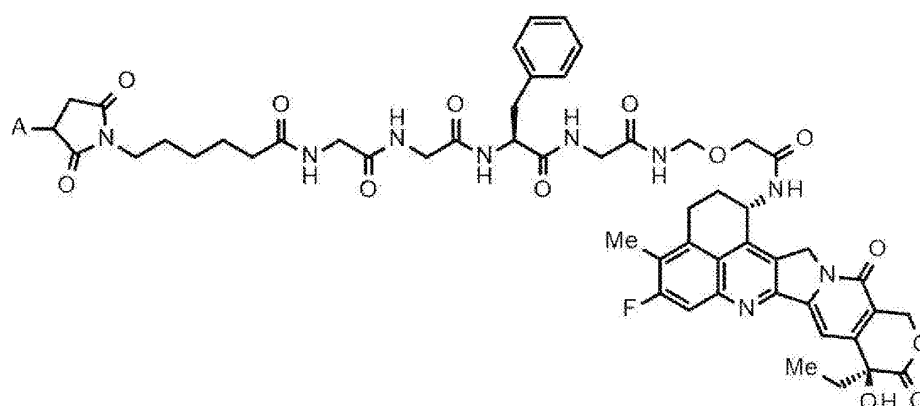
[0214] [化24]



[0215] で示される化合物(33mg;抗体一分子に対して4.4当量)を、10%酢酸水溶液(0.018mL)を含む80%ジメチルスルホキシド水溶液(5.5g)にて溶解させたものを20分かけて加え、同温度にて60分攪拌し、チオール基を有する抗体へ結合させた。次に、0.05M N-アセチルシステイン水溶液(0.68g;抗体一分子に対して5当量)を加え、さらに同温度にて1時間攪拌したのち、10%酢酸水溶液を用いて、pHを5に調整し、式

[0216]

[化25]



[0217] (式中、Aは抗体との結合位置を示す)

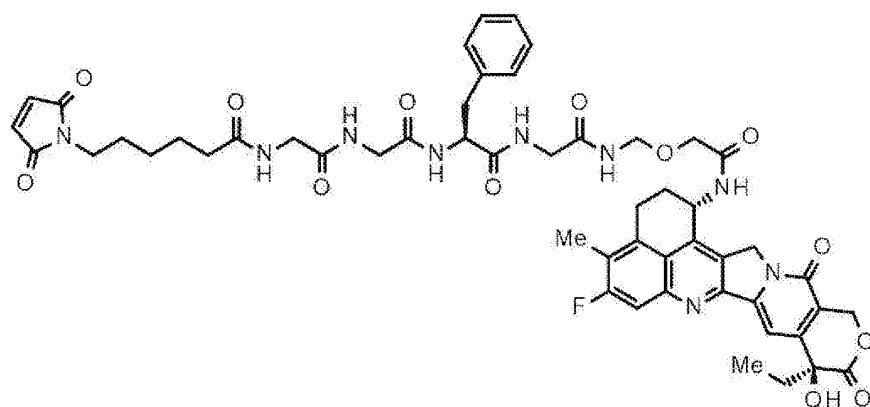
で示される薬物リンカーと、抗B7-H3抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物を含有する溶液を得た。該溶液における各異性体の含有率は、D0：4%、D2：15%、D4：54%（うち、D4-1：65%、D4-2：35%）、D6：21%、D8：5%であった。

[0218] [実施例6] 本発明の方法による抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物の製造

抗B7-H3抗体（配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体）を含む溶液（液重量30.6g：抗体600mg相当）にポリソルベート20の100mg/g水溶液（0.14mL）、0.5mol/L EDTA水溶液（抗体に対し6当量）、0.05mol/L L-ヒスチジン水溶液（30mL）を加えた。10℃攪拌下で、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（2.47mg；抗体一分子に対して2.1当量）を含む水溶液を加え還元し、内温10℃で24時間攪拌することにより、重鎖-軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖-重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するようにした。

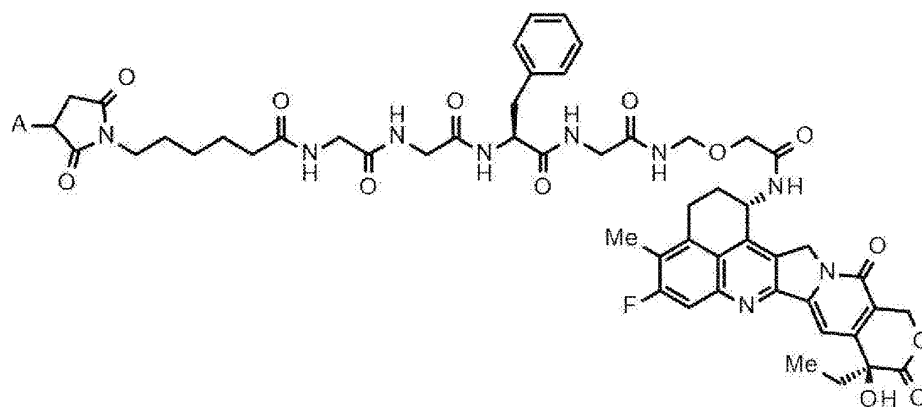
[0219] 得られた反応液に対し、内温9～11℃にて、攪拌下、式

[0220] [化26]



[0221] で示される化合物（20 mg；抗体一分子に対して4.4当量）を、10%酢酸水溶液（0.011 mL）を含む80%ジメチルスルホキシド水溶液（3.3 g）にて溶解させたものを20分かけて加え、同温度にて45分攪拌し、チオール基を有する抗体へ結合させた。次に、0.05 M N-アセチルスチニン水溶液（0.41 g；抗体一分子に対して5当量）を加え、さらに同温度にて45分攪拌したのち、10%酢酸水溶液を用いて、pHを5に調整し、式

[0222] [化27]



[0223] （式中、Aは抗体との結合位置を示す）

で示される薬物リンカーと、抗B7-H3抗体とがチオエーテル結合によって結合した抗B7-H3抗体-薬物コンジュゲート組成物を含有する溶液を得た。該溶液における各異性体の含有率は、D0：4%、D2：22%、D

4 : 5 4 % (うち、D 4 - 1 : 6 4 %、D 4 - 2 : 3 6 %) 、 D 6 : 1 7 %
、 D 8 : 3 %であった。

配列表フリーテキスト

- [0224] 配列番号 1 : 抗 T R O P 2 抗体重鎖のアミノ酸配列
配列番号 2 : 抗 T R O P 2 抗体軽鎖のアミノ酸配列
配列番号 3 : 抗 B 7 - H 3 抗体重鎖のアミノ酸配列
配列番号 4 : 抗 B 7 - H 3 抗体軽鎖のアミノ酸配列
配列番号 5 : 抗 T R O P 2 抗体の C D R H 1 のアミノ酸配列
配列番号 6 : 抗 T R O P 2 抗体の C D R H 2 のアミノ酸配列
配列番号 7 : 抗 T R O P 2 抗体の C D R H 3 のアミノ酸配列
配列番号 8 : 抗 T R O P 2 抗体の C D R L 1 のアミノ酸配列
配列番号 9 : 抗 T R O P 2 抗体の C D R L 2 のアミノ酸配列
配列番号 1 0 : 抗 T R O P 2 抗体の C D R L 3 のアミノ酸配列
配列番号 1 1 : 抗 B 7 - H 3 抗体の C D R H 1 のアミノ酸配列
配列番号 1 2 : 抗 B 7 - H 3 抗体の C D R H 2 のアミノ酸配列
配列番号 1 3 : 抗 B 7 - H 3 抗体の C D R H 3 のアミノ酸配列
配列番号 1 4 : 抗 B 7 - H 3 抗体の C D R L 1 のアミノ酸配列
配列番号 1 5 : 抗 B 7 - H 3 抗体の C D R L 2 のアミノ酸配列
配列番号 1 6 : 抗 B 7 - H 3 抗体の C D R L 3 のアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] (i) 抗体を還元剤と反応させ、チオール基を有する抗体を得る工程；次いで、
- (i i) (i) で得られたチオール基を有する抗体を、薬物リンカー中間体と反応させる工程；を含む、抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造方法であって、
- (i) の工程が、重鎖－軽鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比と、重鎖－重鎖間チオールを4つ有する抗体の構成比とが、定常値に達するまで行われることを特徴とする、製造方法。
- [請求項2] (i) の工程が、4時間以上かけて行われる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] (i) の工程が、12時間以上かけて行われる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4] (i) の工程が、16時間以上かけて行われる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項5] (i) の工程が、20時間以上かけて行われる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項6] (i) の工程が、31時間以上かけて行われる、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項7] (i) の工程が、0～20℃で行われる、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項8] (i) の工程が、5～20℃で行われる、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項9] (i) の工程が、5～10℃で行われる、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項10] (i) の工程が、約10℃で行われる、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項11] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、平均薬物結合数が

3. 5～4. 5である、請求項1～10のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項12] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの含有率が、50%以上である、請求項1～11のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項13] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比が、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比の1.5～2.5倍である、請求項1～12のいずれか1項に記載の製造方法。

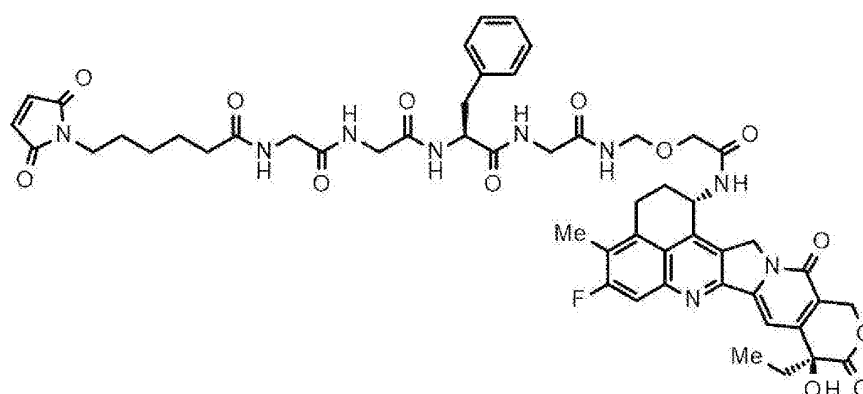
[請求項14] 還元剤が抗体一分子あたり1.9～2.5当量で用いられる、請求項1～13のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項15] 還元剤がトリス（2－カルボキシエチル）ホスフィンまたはその塩である、請求項1～14のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項16] 薬物リンカー中間体が、N－置換マレイミジル基を有する、請求項1～15のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項17] 薬物リンカー中間体が、式

[化1]

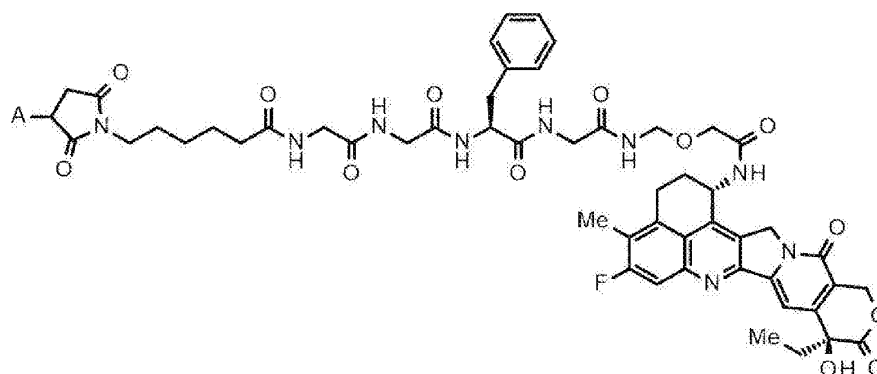


で示される化合物である、請求項1～15のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項18] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、薬物リンカーが、

式

[化2]



(式中、Aは抗体との結合位置を示し、該薬物リンカーは抗体とチオエーテル結合によって結合している)

で示される、請求項17に記載の製造方法。

[請求項19] 抗体が、抗TRO2抗体、又は抗B7-H3抗体である、請求項1～18のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項20] 抗体が、抗TRO2抗体である、請求項19に記載の製造方法。

[請求項21] 抗TRO2抗体が、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖、並びに、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項20に記載の製造方法。

[請求項22] 抗TRO2抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項20に記載の製造方法。

[請求項23] 抗TRO2抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至4

70に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、請求項20に記載の製造方法。

[請求項24] 抗TRO2抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、請求項23に記載の製造方法。

[請求項25] 抗体が、抗B7-H3抗体である、請求項19に記載の製造方法。

[請求項26] 抗B7-H3抗体が、配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖、並びに、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号16に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項25に記載の製造方法。

[請求項27] 抗B7-H3抗体が、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至141に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至128に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項25に記載の製造方法。

[請求項28] 抗B7-H3抗体が、配列番号3においてアミノ酸番号20乃至471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号4においてアミノ酸番号21乃至233に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、請求項25に記載の製造方法。

[請求項29] 抗B7-H3抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、請求項28に記載の製造方法。

[請求項30] 請求項1～29のいずれか1項に記載の製造方法によって製造される、抗体-薬物コンジュゲート組成物。

[請求項31] (i) 抗体を還元剤と反応させ、チオール基を有する抗体を得る工程；次いで、

(i i) (i) で得られたチオール基を有する抗体を、薬物リンカー中間体と反応させる工程；を含む、抗体－薬物コンジュゲート組成物の製造方法であって、

(i) の工程が、0～20℃で4時間以上かけて行われ、製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物における、薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの含有率が、50%以上であり、重鎖－軽鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比が、重鎖－重鎖間チオールに薬物リンカーが4個結合した抗体－薬物コンジュゲートの構成比の1.5～2.5倍であることを特徴とする、製造方法。

[請求項32] (i) の工程が、12時間以上かけて行われる、請求項31に記載の製造方法。

[請求項33] (i) の工程が、16時間以上かけて行われる、請求項31に記載の製造方法。

[請求項34] (i) の工程が、20時間以上かけて行われる、請求項31に記載の製造方法。

[請求項35] (i) の工程が、31時間以上かけて行われる、請求項31に記載の製造方法。

[請求項36] (i) の工程が、5～20℃で行われる、請求項31～35のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項37] (i) の工程が、5～10℃で行われる、請求項31～35のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項38] (i) の工程が、約10℃で行われる、請求項31～35のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項39] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、平均薬物結合数が3.5～4.5である、請求項31～38のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項40] 還元剤が抗体一分子あたり1.9～2.5当量で用いられる、請求

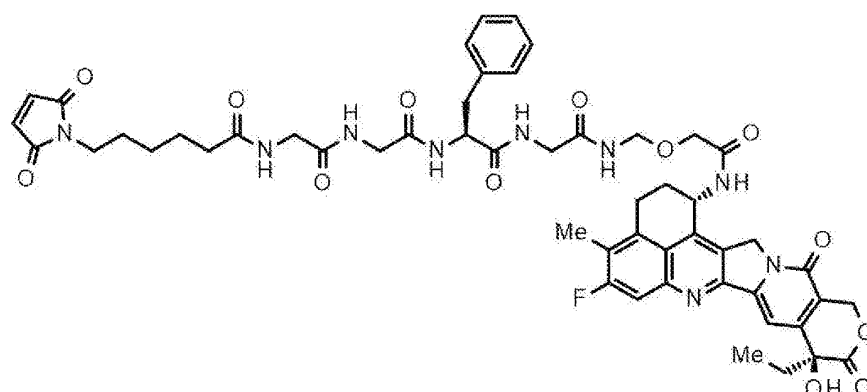
項 3 1 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項41] 還元剤がトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンまたはその塩である、請求項 3 1 ～ 4 0 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項42] 薬物リンカー中間体が、N－置換マレイミジル基を有する、請求項 3 1 ～ 4 1 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項43] 薬物リンカー中間体が、式

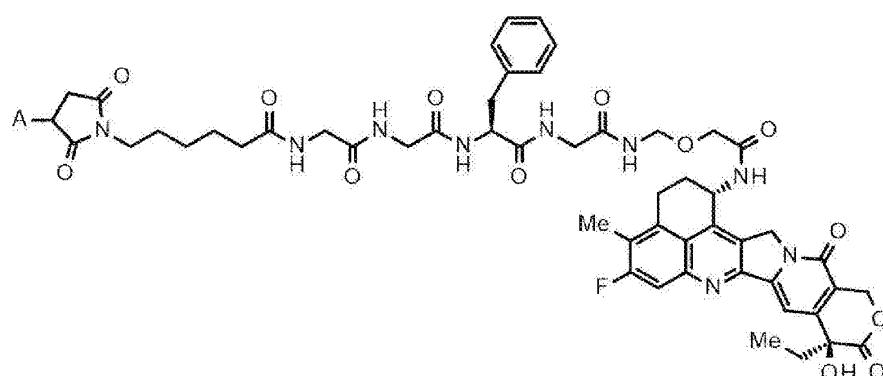
[化3]



で示される化合物である、請求項 3 1 ～ 4 1 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項44] 製造される抗体－薬物コンジュゲート組成物の、薬物リンカーが、式

[化4]



（式中、Aは抗体との結合位置を示し、該薬物リンカーは抗体とチオエーテル結合によって結合している）

で示される、請求項43に記載の製造方法。

- [請求項45] 抗体が、抗TROP2抗体、又は抗B7-H3抗体である、請求項31～44のいずれか1項に記載の製造方法。
- [請求項46] 抗体が、抗TROP2抗体である、請求項45に記載の製造方法。
- [請求項47] 抗TROP2抗体が、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号7に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖、並びに、配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項46に記載の製造方法。
- [請求項48] 抗TROP2抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項46に記載の製造方法。
- [請求項49] 抗TROP2抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号2においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、請求項46に記載の製造方法。
- [請求項50] 抗TROP2抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、請求項49に記載の製造方法。
- [請求項51] 抗体が、抗B7-H3抗体である、請求項45に記載の製造方法。
- [請求項52] 抗B7-H3抗体が、配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖、並びに、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配

列番号 16 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項 51 に記載の製造方法。

[請求項53] 抗 B 7 - H 3 抗体が、配列番号 3 においてアミノ酸番号 20 乃至 41 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖、及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 21 乃至 128 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、を含んでなる抗体である、請求項 51 に記載の製造方法。

[請求項54] 抗 B 7 - H 3 抗体が、配列番号 3 においてアミノ酸番号 20 乃至 471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 21 乃至 233 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる抗体である、請求項 51 に記載の製造方法。

[請求項55] 抗 B 7 - H 3 抗体の、重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している、請求項 54 に記載の製造方法。

[請求項56] 請求項 31 ～ 55 のいずれか 1 項に記載の製造方法によって製造される、抗体-薬物コンジュゲート組成物。