

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-504430

(P2021-504430A)

(43) 公表日 令和3年2月15日(2021.2.15)

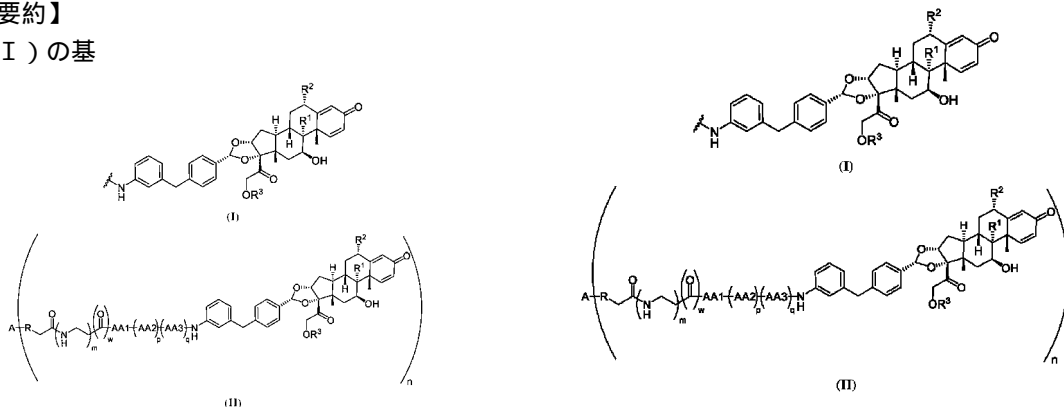
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68 Z N A	4 B 0 6 4
A 6 1 K 31/575 (2006.01)	A 6 1 K 31/575	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 189 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-529611 (P2020-529611)	(71) 出願人	512212195 アッヴィ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、イリノイ・60064、 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ ード・1
(86) (22) 出願日	平成30年11月29日(2018.11.29)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	令和2年7月22日(2020.7.22)	(72) 発明者	ホブソン、エイドリアン・ディー アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 545、シュルーズベリー、ホルマン・ス トリート・25
(86) 国際出願番号	PCT/IB2018/059480	(72) 発明者	オー、ジェイソン・ゼット アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 545、シュルーズベリー、ピバリー・ヒ ル・ドライブ・61
(87) 国際公開番号	W02019/106608		
(87) 国際公開日	令和1年6月6日(2019.6.6)		
(31) 優先権主張番号	62/593,807		
(32) 優先日	平成29年12月1日(2017.12.1)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/595,045		
(32) 優先日	平成29年12月5日(2017.12.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗CD40抗体薬物コンジュゲート

(57) 【要約】

式(I)の基



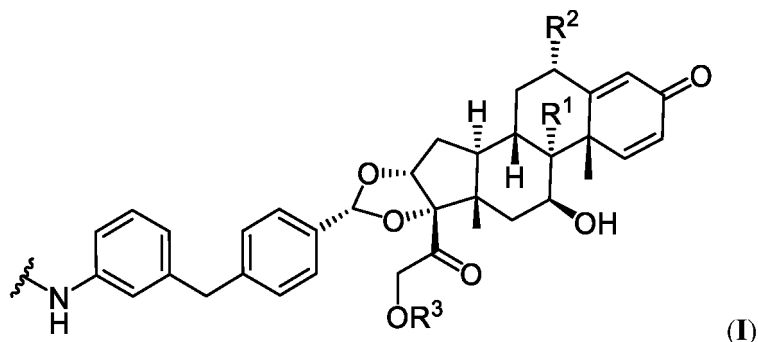
(式中、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は本明細書で定義された通りである。)を含む抗CD40抗体薬物コンジュゲートが本明細書に提供される。式(II)の抗CD40抗体薬物コンジュゲート(式中、Z、R、AA1、AA2、AA3、m、p、q、n、w、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は本明細書で定義された通りである。)がさらに提供される。医薬組成物及びそのキット、並びにこれを使用する方法がさらに提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 として示された相補性決定領域 (CDR) を含む抗 CD40 抗体；並びに
(b) 式 (I) のグルココルチコイド受容体アゴニスト基：

【化 1】



10

(式中、

R^1 は水素又はフルオロであり、

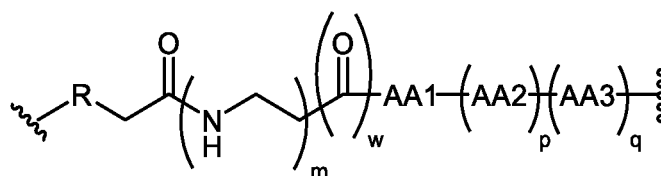
R^2 は水素又はフルオロであり、

R^3 は水素又は $-P(=O)(OH)_2$ である。) を含み、 さらに、前記抗体が、以

20

下の式で表されるリンカー：

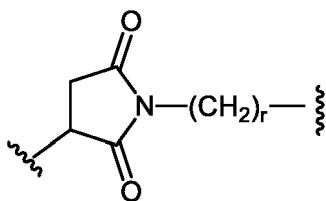
【化 2】



(式中、R は、結合、

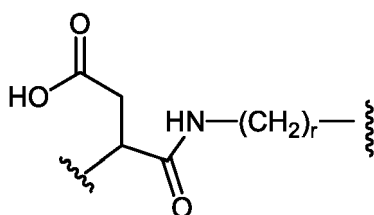
【化 3】

30



又は

【化 4】



40

であり、 r は 0 又は 1 であり、

AA1、AA2、及び AA3 は、独立して、アラニン (Ala)、グリシン (Gly)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、プロリン (Pro)、バリン (Val)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、アルギニン (Arg)、ヒスチジン

50

(His)、リシン(Lys)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、システイン(Cys)、メチオニン(Met)、アスパラギン(Asn)、及びグルタミン(Gln)からなる群から選択され、

mは0又は1であり、

wは0又は1であり、

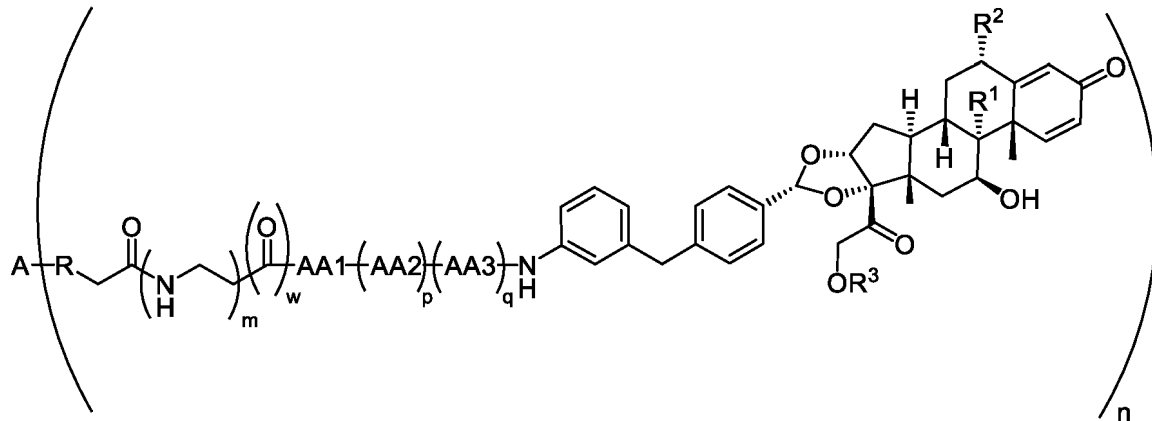
pは0又は1であり、

qは0又は1である。)を介して、前記グルココルチコイド受容体アゴニストにコンジュゲートされている、抗体薬物コンジュゲート。

【請求項2】

式：

【化5】



(式中、Aは前記抗CD40抗体であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。)による、請求項1に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項3】

R¹が水素であり、R²が水素である、請求項1又は2に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項4】

R¹がフルオロであり、R²が水素である、請求項1又は2に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項5】

R¹がフルオロであり、R²がフルオロである、請求項1又は2に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項6】

R³が-P(=O)(OH)₂である、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項7】

R³が水素である、請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項8】

-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-が、-Gly-Glu-、-Ala-Ala-、-Glu-Ala-Ala-、-Gly-Lys-、-Glu-、-Glu-Ser-Lys-及び-Gly-Ser-Lys-からなる群から選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項9】

-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-が、-Gly-Glu-、-Gly-Lys-、-Glu-Ser-Lys-及び-Gly-Ser-Lys-からなる群から選択される、請求項8に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項10】

-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-が、-Gly-Glu-又は-Gly-Ly

10

20

30

40

50

s - である、請求項 9 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 11】

- A A 1 - (A A 2)_p - (A A 3)_q - が、- G l u - S e r - L y s - 又は - G l y - S e r - L y s - である、請求項 9 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

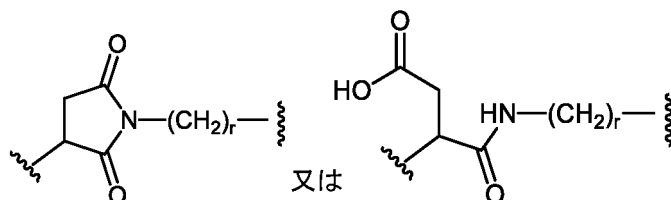
【請求項 12】

m が 0 であり、

q が 0 であり、

R が、

【化 6】



10

である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

m が 0 又は 1 であり、

p が 1 であり、

R が結合である、

20

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 14】

R が結合であり、p が 1 であり、m が 0 であり、w が 0 であり、q が 0 である、請求項 1 ~ 8 又は 10 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 15】

R が結合であり、p が 1 であり、m が 0 であり、w が 0 であり、q が 1 である、請求項 1 ~ 8 又は 11 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 16】

m が 1 であり、w が 1 であり、q が 0 である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

30

【請求項 17】

m が 0 である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 18】

n が 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である、表 5 に列挙された化合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 19】

実施例 4 - コンジュゲート型、実施例 28 - コンジュゲート型、及び実施例 47 - コンジュゲート型からなる群から選択される、請求項 18 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 20】

n が 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である、表 6 A に列挙された化合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

40

【請求項 21】

実施例 6 - コンジュゲート型、実施例 7 - コンジュゲート型、実施例 12 - コンジュゲート型、及び実施例 13 - コンジュゲート型からなる群から選択される、請求項 20 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 22】

n が 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である、表 6 B に列挙された化合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 23】

実施例 6 - 加水分解型、実施例 7 - 加水分解型、実施例 12 - 加水分解型、及び実施例

50

1 3 - 加水分解型からなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 4】

実施例 1 2 - 加水分解型及び実施例 1 3 - 加水分解型からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 5】

n が 2、4、6、又は 8 である、請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 6】

n が 2 である、請求項 2 5 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

10

【請求項 2 7】

n が 4 である、請求項 2 5 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 8】

n が 2 である、実施例 4 7 - コンジュゲート型である、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 2 9】

n が 4 である、実施例 4 7 - コンジュゲート型である、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3 0】

n が 2 である、実施例 2 8 - コンジュゲート型である、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

20

【請求項 3 1】

n が 4 である、実施例 2 8 - コンジュゲート型である、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3 2】

前記抗体が、配列番号 5 として示された重鎖可変領域及び配列番号 6 として示された軽鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3 3】

前記抗体が、配列番号 3 として示された重鎖を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

30

【請求項 3 4】

前記抗体が、配列番号 4 として示された軽鎖を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3 5】

前記抗体が、配列番号 3 として示された重鎖及び配列番号 4 として示された軽鎖を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 3 7】

40

治療を必要とする対象において、炎症性腸疾患 (I B D)、全身性エリテマトーデス (S L E)、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎 (H S) からなる群から選択される状態を治療する方法であって、有効量の、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート又は請求項 3 6 に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、全内容が参照により本明細書に組み込まれている、2017年12月1日出願した米国仮出願第 62 / 593 , 807 号及び2017年12月5日出願した米国

50

仮出願第 62 / 595 , 045 号の優先権を主張するものである。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれている配列表を含有する。2018年11月29日に作成された前記ASCIIコピーは、A103017__1480WO__SL.txと命名され、サイズは13,520バイトである。

【背景技術】

【0003】

CD40は、広範囲な造血（リンパ球、単球、樹状）細胞型及び非造血（上皮、内皮、線維芽細胞）細胞型に発現する48kDa I型膜貫通タンパクである（van Kooten、J Leukoc Biol、2000年1月；67巻（1号）：2～17頁）。CD40は、B細胞の発生、リンパ球の活性化、及び抗原提供細胞（APC）機能に重要な役割を果たす腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーメンバーである。

【0004】

CD40/CD40Lシグナル伝達経路は、全身性エリテマトーデス（SLE）、炎症性腸疾患（IBD）、多発性硬化症、関節リウマチ、及びシェーグレン症候群を含む多くの自己免疫疾患の病因に関わってきた（Law and Grewal、Adv Exp Med Biol、2009年；647巻：8～36頁）。CD40の発現は、慢性自己免疫によりダメージを受けた、腎臓、腸、及び関節を含む組織において、マクロファージ、内皮、上皮、及びB細胞上で上昇する（Borchering、Am J Pathol、2010年4月；176巻（4号）：1816～27頁；Sawada-Hase、Am J Gastroenterol、2000年6月；95巻（6号）：1516～23頁）。溶解性CD40Lは、SLE、IBD、及びシェーグレン症候群に罹患した対象において、これら対象における炎症負荷と一致して上昇する。

【0005】

慢性腸炎症におけるCD40/CD40L経路の最も早期の証拠の一部は、抗CD40L mAbsが実験的大腸炎からげっ歯類を保護した、臨床前モデルから得たものであった（de Jong、Gastroenterology、2000年9月；119巻（3号）：715～23頁；Liu、J Immunol、2000年6月1日；164巻（11号）：6005～14頁；Stuber、J Exp Med、1996年2月1日、183巻（2号）：693～8頁）。疾患活性スコアの減少は、腸における炎症誘発性サイトカイン産生の減少及び慢性の体重損失からの保護に関連した。CD40又はCD40Lが遺伝的に欠如した動物において類似の結果が観察された（de Jong、Gastroenterology、2000年9月；119巻（3号）：715～23頁）。疾患発症後の抗CD40L mAbsでのマウスの処置は疾患活性を減少させるのに依然として有効であり、慢性炎症性疾患を維持するためにこの経路が重大であることを示唆している。加えて、CD40アゴニスト抗体はリンパ球が欠乏しているマウスにおいて腸の炎症を促進させるのに十分である（Uhlir、Immunity、2006年8月；25巻（2号）：309～18頁）。CD40 siRNAを使用したより最近のデータはまた、大腸炎におけるCD40シグナル伝達に対する重要な役割を指摘している（Arranz、J Control Release、2013年2月10日；165巻（3号）：163～72頁）。クローン病では、粘膜固有層単球及び上皮は高レベルのCD40を発現し、CD40+単球は末梢血中で富化する。さらに、CD40位置における多形性はIBDに対する感受性の増加に連結している。抗TNF抗体で治療したクローン病の対象において、転写プロファイリングは、薬物治療の応答が十分な対象ではCD40 mRNAレベルが低減していることを示している。しかし、TNF阻害剤に対する応答が弱い対象では、CD40 mRNAレベルは変化しておらず、CD40依存性の、TNFから独立した経路がこれらの対象において炎症を促進し得ることを示唆している。実験は、CD40媒介性シグナル伝達の阻害がIBD並びに他の自己免疫疾患の発生におい

10

20

30

40

50

て重要であることを示唆している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】van Kooten、J Leukoc Biol. 2000年1月；67巻(1号)：2～17頁

【非特許文献2】(Law and Grewal、Adv Exp Med Biol.、2009年；647巻：8～36頁

【非特許文献3】Borchering、Am J Pathol.、2010年4月；176巻(4号)：1816～27頁

10

【非特許文献4】Sawada-Hase、Am J Gastroenterol.、2000年6月；95巻(6号)：1516～23頁

【非特許文献5】de Jong、Gastroenterology.、2000年9月；119巻(3号)：715～23頁

【非特許文献6】Liu、J Immunol.、2000年6月1日；164巻(11号)：6005～14頁

【非特許文献7】Stuber、J Exp Med、1996年2月1日、183巻(2号)：693～8頁

【非特許文献8】Uhlig、Immunity.、2006年8月；25巻(2号)：309～18頁

20

【非特許文献9】Arranz、J Control Release. 2013年2月10日；165巻(3号)：163～72頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、様々な炎症性及び自己免疫性状態の治療に有用な新規CD40アンタゴニストに対する必要性が依然として継続して存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

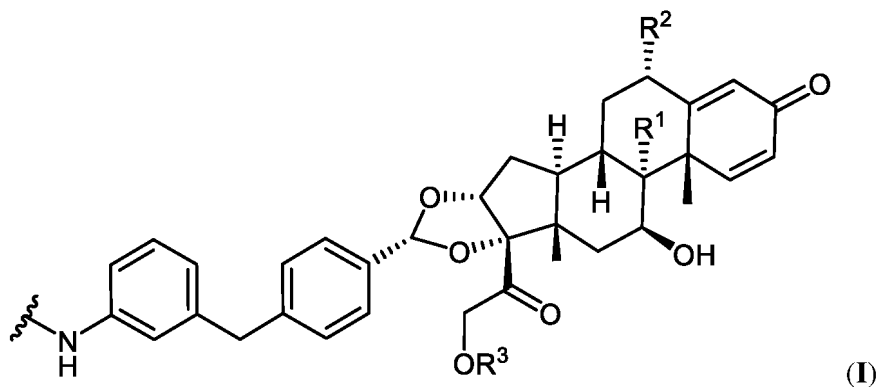
(発明の要旨)

30

一態様において、本開示は、(a)配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示される相補性決定領域(CDR)を含む抗CD40抗体、並びに(b)式(I)のグルコルチコイド受容体アゴニストの基：

【0009】

【化1】



40

(式中、

R¹ は水素又はフルオロであり、

R² は水素又はフルオロであり、

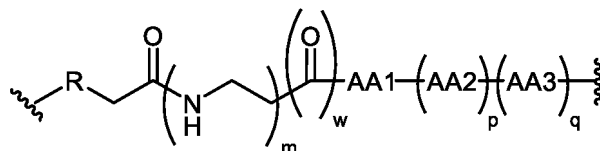
R³ は水素又は - P(=O)(OH)₂ である。)を含み、

50

さらに、抗体が、以下の式で表されるリンカー：

【 0 0 1 0 】

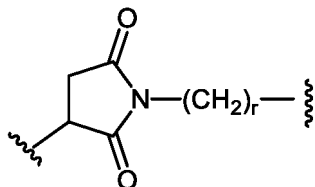
【 化 2 】



(式中、R は、結合、

【 0 0 1 1 】

【 化 3 】

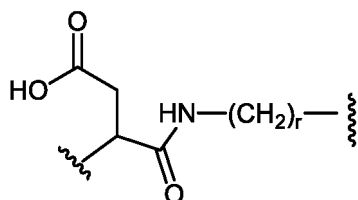


10

又は

【 0 0 1 2 】

【 化 4 】



20

(式中、r は 0 又は 1 である。) であり、

AA1、AA2、及び AA3 は、独立して、アラニン (Ala)、グリシン (Gly)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、プロリン (Pro)、バリン (Val)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、アルギニン (Arg)、ヒスチジン (His)、リシン (Lys)、セリン (Ser)、スレオニン (Thr)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、アスパラギン (Asn)、及びグルタミン (Gln) からなる群から選択され、

30

m は 0 又は 1 であり、

w は 0 又は 1 であり、

p は 0 又は 1 であり、

q は 0 又は 1 である。) で表されるリンカーを介して、グルココルチコイド受容体アゴニストにコンジュゲートしている抗体薬物コンジュゲートを提供する。

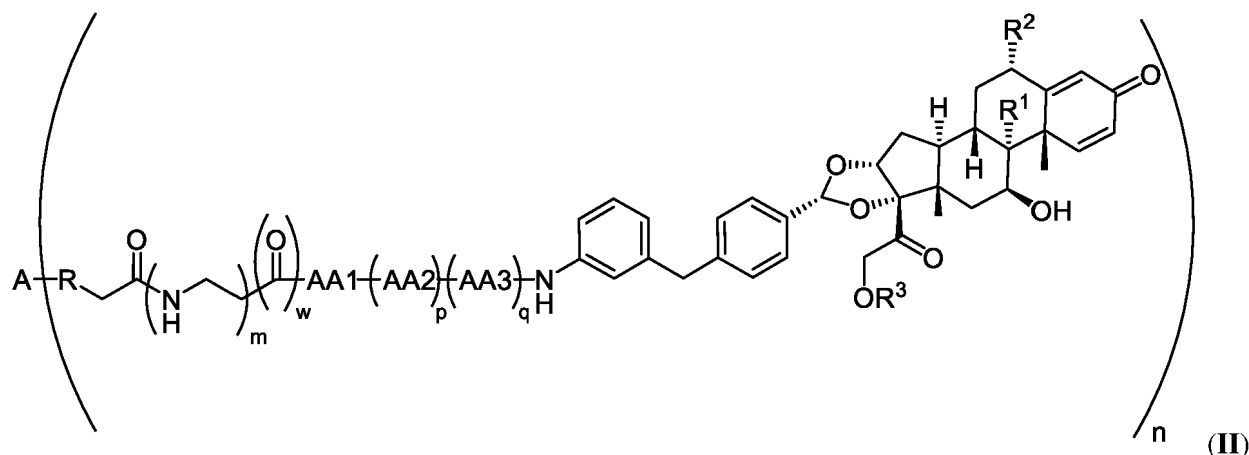
【 0 0 1 3 】

40

別の実施形態において、本開示は、式 (II) による抗体薬物コンジュゲート：

【 0 0 1 4 】

【化 5】



(式中、Aは抗CD40抗体であり、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。)を提供する。

【0015】

ある特定の実施形態において、nは2、4、6、又は8である。ある特定の実施形態において、nは2である。ある特定の実施形態において、nは4である。

20

【0016】

一実施形態において、本開示は、R¹が水素であり、R²が水素である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。一実施形態において、本開示は、R¹がフルオロであり、R²が水素である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。一実施形態において、本開示は、R¹がフルオロであり、R²がフルオロである、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。一実施形態において、本開示は、R³が-P(=O)(OH)₂である、抗体薬物コンジュゲートを提供する。別の実施形態において、本開示は、R³が水素である、抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0017】

一実施形態において、本開示は、-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-が、-Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-; -Glu-Ser-Lys-; 及び-Gly-Ser-Lys-からなる群から選択される、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、AA1-(AA2)_p-(AA3)_qは、-Gly-Glu-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; 及び-Gly-Ser-Lys-からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、AA1-(AA2)_p-(AA3)_qは-Gly-Glu-又は-Gly-Lys-である。ある特定の実施形態において、AA1-(AA2)_p-(AA3)_qは-Glu-Ser-Lys-又は-Gly-Ser-Lys-である。

30

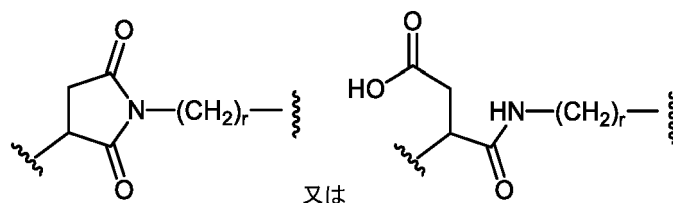
40

【0018】

一実施形態において本開示は、mが0であり、qが0であり、Rが

【0019】

【化 6】



である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0020】

一実施形態において本開示は、 m が 0 又は 1 であり、 p が 1 であり、 R が結合である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

10

【0021】

一実施形態において本開示は、 m が 1 であり、 w が 1 であり、 q が 0 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0022】

一実施形態において本開示は、 m が 0 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0023】

ある特定の実施形態において、本開示は、 R が結合であり、 p が 1 であり、 m が 0 であり、 w が 0 であり、 q が 0 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、 R が結合であり、 p が 1 であり、 m が 0 であり、 w が 0 であり、 q が 1 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

20

【0024】

一実施形態において本開示は、 n が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 である、表 5 に列挙された化合物からなる群から選択される、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、 n は 2、4、6 又は 8 である。ある特定の実施形態において、 n は 2 である。ある特定の実施形態において、 n は 4 である。

【0025】

一実施形態において、本開示は、実施例 4 - コンジュゲート型、実施例 28 - コンジュゲート型、及び実施例 47 - コンジュゲート型からなる群から選択される、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、抗体薬物コンジュゲートが実施例 47 - コンジュゲート型であり、 n が 2 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、抗体薬物コンジュゲートが実施例 47 - コンジュゲート型であり、 n が 4 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、抗体薬物コンジュゲートが実施例 28 - コンジュゲート型であり、 n が 2 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、抗体薬物コンジュゲートが実施例 28 - コンジュゲート型であり、 n が 4 である、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

30

40

【0026】

一実施形態において本開示は、 n が 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 である、表 6 A 又は 6 B に列挙された化合物からなる群から選択される、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の実施形態において、 n は 2、4、6 又は 8 である。ある特定の実施形態において、 n は 2 である。ある特定の実施形態において、 n は 4 である。

【0027】

一実施形態において本開示は、実施例 6 - コンジュゲート型、実施例 6 - 加水分解型、

50

実施例 7 - コンジュゲート型、実施例 7 - 加水分解型、実施例 12 - コンジュゲート型、実施例 12 - 加水分解型、実施例 13 - コンジュゲート型、及び実施例 13 - 加水分解型からなる群から選択される、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0028】

一実施形態において本開示は、実施例 12 - 加水分解型、実施例 13 - 加水分解型からなる群から選択される、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートを提供する。

【0029】

ある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートの抗体は、配列番号 5 として示される重鎖可変領域及び配列番号 6 として示される軽鎖可変領域を含む。

10

【0030】

ある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートの抗体は、配列番号 3 とし示される重鎖を含む。ある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートの抗体は配列番号 4 として示される軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートの抗体は配列番号 3 として示される重鎖及び配列番号 4 として示される軽鎖を含む。

【0031】

一実施形態において、本開示は、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲート、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0032】

一実施形態において、本開示は、これを必要とする対象において、炎症性腸疾患（IBD）、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎（HS）からなる群から選択される状態を治療する方法であって、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲート又は任意の先行する実施形態による医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。

20

【0033】

一実施形態において、本開示は、（a）任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲート又は任意の先行する実施形態による医薬組成物を含む容器；及び（b）1 個以上の容器上の又はこれに付随するラベル又はパッケージ添付文書を含むキットであって、該抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物が、炎症性腸疾患（IBD）、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎（HS）からなる群から選択される状態を治療するために使用されることをラベル又はパッケージ添付文書が示すキットを提供する。

30

【0034】

先行する実施形態のいずれかにおいて、IBD は潰瘍性大腸炎（UC）又はクローン病である。

【0035】

一実施形態において、本開示は、グルココルチコイド受容体アゴニストを CD40 発現細胞に送達する方法であって、細胞を任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートに接触させるステップを含む方法を提供する。

40

【0036】

一実施形態において、本開示は、抗体薬物コンジュゲートの抗炎症性を決定する方法であって、（a）CD40 発現細胞を、任意の先行する実施形態による抗体薬物コンジュゲートに接触させるステップ、及び（b）対照細胞と比較して、細胞からの炎症誘発性サイトカインの放出の減少を決定するステップを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図 1A】ADC 実施例 2 において提供された、実施例 4 - コンジュゲート型（ヒト）（n = 4）のデコンボリューション処理した質量分析データを表している。25140、73 ピークは 1 つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした軽鎖（配列番号 4）に対応する

50

。50917.59ピークは、1つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした重鎖（配列番号3）に対応する。

【図1B】保持時間が約7.5分間である、ADC実施例2において提供された、実施例28-コンジュゲート型（ヒト）（ $n=2$ ）に対するアニオン性交換クロマトグラフィー（AEC）データを表している。

【図1C】ADC実施例2において提供された、実施例4-コンジュゲート型（ヒト）（ $n=2$ ）のデコンボリューション処理した質量分析データを表している。25176.72ピークは、1つの薬物リンカー分子とコンジュゲートした軽鎖（配列番号2）に対応している。50954.63ピークは、1つの薬物リンカー分子とコンジュゲートした重鎖（配列番号1）に対応している。

【図1D】保持時間が約13分間である、ADC実施例2において提供された、実施例28-コンジュゲート型（ヒト）（ $n=4$ ）に対するアニオン性交換クロマトグラフィー（AEC）データを表している。

【図1E】ADC実施例2において提供された、実施例4-コンジュゲート型（ヒト）（ $n=4$ ）のデコンボリューション処理した質量分析データを表している。25176.88ピークは、1つの薬物リンカー分子とコンジュゲートした軽鎖（配列番号2）に対応している。50954.80ピークは、1つの薬物リンカー分子とコンジュゲートした重鎖（配列番号1）に対応している。

【図2】実施例Cに記載されているように、LPS及びCD40Lで刺激したヒトMDCアッセイにおける抗ヒトCD40 ADCのインビトロ活性を表している。図2のデータは、試験した2種のADC化合物のうちのいずれかによる免疫細胞活性化を阻害する最大能力が、親アンタゴニスト抗体により提供される阻害を超えることを実証している。

【図3】実施例Dに記載されているように、LPS及びCD40Lで刺激したマウスBMDアッセイにおける抗マウスCD40 ADCのインビトロ活性を表している。図3に示されている結果は、実施例6-加水分解型（マウス）による免疫細胞活性化を阻害する最大能力が、親アンタゴニスト抗体により提供される阻害を超えることを実証している。

【図4】実施例Eに記載されているように、LPS誘発性急性炎症における、実施例6-加水分解型（マウス）（ $n=4$ ）のインビボ活性を表している。図4に示されている結果は、CD40 ADCが、インビボでのDC活性化を抑制する効力が、親アンタゴニスト抗体又はイソタイプADCよりも大きいことを示すことを実証している。

【図5A】実施例Fに記載されているように、DTH応答における抗マウスCD40 ADC（実施例12-加水分解型（マウス））のインビボ活性を表している。図5Aにおけるデータは、親のアンタゴニスト抗体又は非標的ADC単独よりも、T細胞媒介性炎症をインビボでより強力に阻害するCD40 ADCの増強された効力を実証している。

【図5B】実施例Fに記載されているように、DTH応答における抗マウスCD40 ADC（実施例28-コンジュゲート（マウス））のインビボ活性を表している。図5Bにおけるデータは、親のアンタゴニスト抗体又は非標的ADC単独よりも、T細胞媒介性炎症をインビボでより強力に阻害するCD40 ADCの増強された効力を実証している。

【図6】実施例Hに記載されているように、マウスコラーゲン誘発性関節炎（CIA）における抗マウスCD40 ADCのインビボ活性を表している。図6のデータは、単回用量の抗マウスCD40ステロイドADCが、対照1及び2と比較して、約6週間の間、足の腫れの回復を介してより長い作用期間を示すことができることを実証している。

【発明を実施するための形態】

【0038】

定義

「ヒトCD40」及び「ヒトCD40野生型」（本明細書ではhCD40、hCD40wtと略記する）という用語は、本明細書で使用される場合、I型膜貫通タンパクを指す。一実施形態において、ヒトCD40という用語は、標準的組換え型発現方法により調製することができる、組換え型ヒトCD40（rhCD40）を含むことを意図する。表1は、ヒトCD40（すなわち、配列番号1）及びその細胞外ドメインのアミノ酸配列（す

10

20

30

40

50

なわち、配列番号 2) を提供するものである。

【 0 0 3 9 】

【 表 1 】

表1. ヒトCD40配列	
タンパク質	配列
ヒト CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDC TEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTIC TCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSS AFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCQPQDRLRALVVIPIIFGILFAIL LVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPV TQEDGKESRISVQERQ (配列番号1)
ヒト CD40 細胞外ドメイン	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNR ETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESC (配列番号2)

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ジスルフィド結合で相互接続された、4つのポリペプチド鎖、2つの重鎖(H)及び2つの軽鎖(L)で構成されるイムノグロブリン分子を指すことを意図する。各重鎖は重鎖可変領域(本明細書ではHCVR又はVHと略記する)及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は3つのドメイン、CH1、CH2及びCH3で構成される。各軽鎖は軽鎖可変領域(本明細書ではLCVR又はVLと略記する)及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は1つのドメイン、CLで構成される。VH及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存された領域が分散している、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性領域へとさらに分割することができる。各VH及びVLは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される、3つのCDR及び4つのFRで構成される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【 0 0 4 1 】

抗体の「抗原結合部分」(又は単に「抗体部分」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原(例えば、TNF)に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片により実施され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含される結合断片の例として(i)Fab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片;(ii)F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結している2つのFab断片を含む二価断片;(iii)VH及びCH1ドメインからなるFd断片;(iv)抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFv断片、(v)VHドメインからなるdAb断片(Wardら、(1989年)Nature、341巻:544~546頁);並びに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHは別個の遺伝子によりコード化されているが、これらは組換え法を使用して合成リンカーで連結することができ、これらはこの合成リンカーにより、VL及びVH領域が対となって一価分子を形成する単一タンパク質鎖を作製することが可能となる(一本鎖Fv(scFv)としても公知である);例えば、Birdら(1988年)Science、242巻:423~426頁;及びHustonら(1988年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻:5879~5883頁を参照されたい)。このような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語の中に包含されることが意図される。他の形態の一本鎖抗体、例えば、ダイアボディもまた包含される。ダイアボディとは、VH及びVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、よって、ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対形成するようにして、2つの抗原結合部位を作り出す、二価の、二重特異性抗体である(例えば、Holliger、P.ら(199

3年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444~6448頁; Poljak、R. J. ら(1994年)、Structure 2: 1121~1123を参照されたい)。

【0042】

抗体の「可変領域」とは、抗体軽鎖の可変領域又は抗体重鎖の可変領域を、単独で又は組み合わせて指す。重鎖及び軽鎖の可変領域は4つのフレームワーク領域(FR)及び超可変領域としても公知の3つの相補性決定領域(CDR)をそれぞれ有する。CDRは抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するために少なくとも2つの技術が存在する:(1)異種間の配列ばらつきに基づく手法(例えば、Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、(第5版、1991年、National Institutes of Health、Bethesda Md.))及び(2)抗原-抗体複合体の結晶実験に基づく手法(Al-lazikaniら(1997年)J. Molec. Biol. 273巻: 927~948頁))。加えて、これらの2つの手法の組合せが、時にはCDRを決定するために当技術分野で使用されている。

10

【0043】

「同一の」又は「同一性」パーセントという用語は、2種又はこれより多くの核酸又はポリペプチドとの関連で、配列同一性の一部として任意の保存アミノ酸置換を考慮せずに、最も一致するように比較及び並べた場合(必要に応じてギャップを導入して)、同じである、又は同じであるヌクレオチド若しくはアミノ酸残基の特定されたパーセンテージを有する2種又はこれより多くの配列又はサブ配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェア又はアルゴリズムを使用して、又は目視検査により測定することができる。アミノ酸又はヌクレオチド配列のアライメントを得るために使用することができる様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当技術分野で公知である。配列アライメントアルゴリズムのこのような非限定的例の1つがKarlinら、Proc. Natl. Acad. Sci.、87巻: 2264~2268頁(1990年)において記載されているアルゴリズム、これが修飾されたものがKarlinら、Proc. Natl. Acad. Sci.、90巻: 5873~5877頁(1993年)に記載され、NBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている(Altschulら、Nucleic Acid Res.、25巻: 3389~3402頁(1997年))。ある特定の実施形態において、第1のアミノ酸配列の、第2の配列アミノ酸に対する同一性パーセンテージ「X」は、 $100 \times (Y/Z)$ として計算される(式中、Yは、第1及び第2の配列のアライメント(目視検査、又は特定の配列アライメントプログラムにより並べた場合)において同一適合として採点されたアミノ酸残基の数であり、Zは第2の配列における残渣の総数である)。第1の配列の長さが第2の配列よりも長い場合、第1の配列の、第2の配列に対するパーセント同一性は、第2の配列の、第1の配列に対するパーセント同一性よりも長くなる。

20

30

【0044】

非限定的例として、ある特定の実施形態において、任意の特定のポリヌクレオチドが基準配列に対してある特定のパーセンテージ配列同一性(例えば、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、及び一部の実施形態において、少なくとも95%同一、96%同一、97%同一、98%同一、又は99%同一)を有するかどうか、Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for Unix、Genetics Computer Group、University Research Park、575 Science Drive、Madison、WI 53711)を使用して決定することができる。Bestfitは、Smith and Watermanのローカル相同性アルゴリズム(Advances in Applied Mathematics 2: 482~489(1981年))を使用して、2つの配列間の相同性の最も良いセグメントを発見する。Bestfit又は任意の他の配列アライメントプログラムを

40

50

使用して、特定の配列が、例えば、本開示による基準配列と95%同一であるかどうか決定する場合、同一性パーセンテージが基準ヌクレオチド配列の全長にわたり計算され、相同性におけるギャップが基準配列内のヌクレオチドの総数の5%まで許容されるようにパラメーターが設定される。

【0045】

一部の実施形態において、2つの核酸又はポリペプチドは実質的に同一であるとは、配列比較アルゴリズムを使用して、又は目視検査により測定する場合、最大一致が得られるよう比較し、並べた際に、これらが少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、及び一部の実施形態において少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド又はアミノ酸残基同一性を有することを意味する。同一性は、少なくとも約10、約20、約40～60個の残基の長さ又はその間の任意の積分値である配列領域にわたり存在することができ、60～80個の残基よりも長い領域、例えば、少なくとも約90～100個の残基の領域にわたることができ、一部の実施形態において、配列は、比較された配列、例えば、ヌクレオチド配列のコーディング領域の全長にわたり実質的に同一である。

【0046】

「保存アミノ酸置換」とは、1つのアミノ酸残基が類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えられているものである。塩基性の側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、帯電していない極性の側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、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）、 β -分枝の側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含めた、類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーが当技術分野で定義されている。例えば、チロシンに対するフェニルアラニンの置換は保存的置換である。一部の実施形態において、ポリペプチドの配列及び本開示の抗体における保存的置換は、アミノ酸配列を含有する抗体の、抗原（複数可）への結合、例えば、CD40の、結合する抗体への結合を取り消すことはない。抗原結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸保存的置換を同定する方法は当技術分野で周知である（例えば、Brummellら、Biochem. 32巻：1180～1187頁（1993年）；Kobayashiら、Protein Eng. 12巻（10号）：879～884頁（1999年）；及びBurksら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻：412～417頁（1997年）を参照されたい）。

【0047】

「結合親和性」とは、一般的に、分子の単一結合部位（例えば、抗体又はその抗原結合部分）と、結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合の相互作用の合計の強度を指す。別途示されていない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1：1相互作用を反映する内因性の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は一般的に解離定数（ K_d ）で表すことができる。親和性は当技術分野で公知の一般的方法で測定することができる。親和性の低い抗体は一般的に抗原にゆっくりと結合し、容易に分離する傾向にあるのに対して、親和性の高い抗体は一般的に抗原により速く結合し、より長く結合したまま留まる傾向にある。結合親和性を測定する様々な方法は当技術分野で公知である。

【0048】

「アンタゴニスト」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒトCD40（hCD40）の生物学的又は免疫学的活性を遮断又は減少させる抗体又はその抗原結合部分を指す。hCD40のアンタゴニスト抗体、又はその抗原結合部分は、例えば、CD40Lと共に培養された（又はこれに曝露された）初代ヒトB細胞（例えば、B細胞をCD40L-発現ヒトT細胞と共に培養する）のCD86の上方調節を阻害することができる。一実施形態において、アゴニスト活性を実質的に含まないアンタゴニスト抗CD40抗体、又

はその抗原結合部分は、アゴニストアッセイ、例えば、PCT公開WO2016/196314の実施例7に記載されているアゴニスト単球アッセイにおいて、陰性対照と同等の又は陰性対照から1標準偏差の範囲内である活性レベルを有すると定義される。アゴニスト及びアンタゴニスト活性はまた、当技術分野で公知の方法、例えば、NFκB媒介性アルカリホスファターゼ（AP）に連結したヒトCD40を発現するCD40発現リポーター細胞株を使用する方法、又はB細胞アッセイなどを使用して評価することもできる。

【0049】

「糖質コルチコステロイドの基」は、親糖質コルチコステロイドのアミノ基からの水素原子の除去から誘導される。水素原子の除去は、親糖質コルチコステロイドのリンカーへの結合を促進する。

10

【0050】

「薬剤含有量」及び「薬物抗体比率」（DAR）という用語は、本明細書で交換可能なように使用され、リンカーを介して、抗体に接続された糖質コルチコステロイド基の数を指す。式（I）の基を含む抗体薬物コンジュゲート、又は、例えば、及び個々のADCを意味する、式（II）の抗体薬物コンジュゲートの「薬剤含有量」又は「薬物抗体比率」（DAR）とは、個々の抗体に連結している糖質コルチコステロイド分子の数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の薬剤含有量、又は変数nはそれぞれ1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である）（「化合物DAR」）を指す。さらに、抗体薬物コンジュゲートの集団の薬物抗体比率（DAR）（例えば、収集された組成物又は画分中に提供されたもの）とは、付与された集団において抗体に連結している糖質コルチコステロイド分子の平均数、例えば、薬剤含有量又は $1 \sim 10 \pm 0.5$ 、 ± 0.4 、 ± 0.3 、 ± 0.2 、又は ± 0.1 の整数又は分数としてのn（「集団DAR」）を指す。

20

【0051】

「対象」という用語は、これらに限定されないが、特定の治療のレシピエントとなるヒト、ヒト以外の霊長類、げっ歯類などを含む任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。

【0052】

本明細書中に開示される抗体薬物コンジュゲートの「有効量」とは、具体的に述べられている目的を行うのに十分な量である。「有効量」は、述べられている目的との関連で決定することができる。

30

【0053】

「治療有効量」という用語は、対象又は哺乳動物において疾患又は障害を「治療する」のに有効な抗体薬物コンジュゲートの量を指す。「防止的有效量」とは、所望の防止的結果を達成するのに有効な量を指す。

【0054】

「治療する」又は「治療」又は「治療すること」又は「緩和する」又は「緩和すること」などの用語は、診断された病的状態又は障害の1つ以上の症状を治癒する、減速させる、軽減する、及び/又はその進行を減速させる若しくは停止する療法による対策を指す（「療法による治療」）。よって、療法による治療を必要とするものとして、すでに障害と診断されている、又は障害を有する疑いがあるものが挙げられる。防止的又は予防的対策は、標的とする病理学的状態又は障害の発症を予防する対策を指す（「防止的治療」）。よって、防止的治療を必要とする者として、障害を起こす傾向があるもの及び障害が予防されるべき者が挙げられる。

40

【0055】

詳細な説明

本開示は、抗CD40抗体に連結されているグルココルチコイド受容体アゴニストを含む抗体薬物コンジュゲート（ADC）を提供する。

【0056】

炎症性腸疾患、例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎において、腸バリア完全性の損失は、共生細菌の腸管粘膜への侵入を可能にする。対応する宿主免疫応答は炎症の増悪を結

50

果として生じる。免疫細胞の微生物の活性化は、CD40シグナル伝達に関わりなく生じ得るので、その効力を限定するAb-102などの抗CD40アンタゴニストを用いた治療により影響を受けないままである。しかし、抗CD40抗体に連結したグルココルチコイド受容体アゴニストは、CD40媒介性活性化を遮断するだけでなく、そのグルココルチコイド受容体アゴニストペイロードの内面化及び放出の際に、Toll様受容体(TLR)を介して微生物由来分子の炎症性シグナル伝達も阻害する。この二重機序は、活性化した炎症細胞に対して最大の阻害性応答を示し、抗CD40アンタゴニスト単独の場合と比較して効力の増強をもたらす。

【0057】

実施例Cのデータは、図2及び表18に提供されているように、この仮説を確定する。半接着性単球由来の樹状細胞(初代ヒト末梢血単核細胞由来)を、リポ多糖(LPS)で予め刺激して、細胞-表面CD40発現の上方調節を誘発した。抗CD40抗体単独(対照1)での洗浄及び前処理と対比させた、選択された抗ヒトCD40 ADCでの洗浄及び前処理の後、細胞をLPS及び/又はCD40Lで活性化し、炎症誘発性サイトカインIL-6の分泌を定量化した。データは、抗CD40抗体単独(対照1)では炎症性シグナル伝達を部分的に抑制するが、試験した抗ヒトCD40 ADCは、追加の炎症性の、CD40から独立したシグナル伝達を完全に抑制する(すなわち、LPS事前刺激(点線)以前のレベルまで)ことを実証している。

【0058】

I. 抗CD40抗体

「抗CD40抗体」及び「抗CD40抗原結合部分」という用語は、ヒトCD40のアンタゴニストである全長抗体及び抗原結合部分をそれぞれ指す。ヒトCD40に対する全長アミノ酸配列は、表1、配列番号1において提供されている。アミノ酸を含有するヒトCD40の細胞外ドメインは表1、配列番号2において提供されている。

【0059】

一実施形態において、抗体、又はその抗原結合部分は、抗体、又はその抗原結合部分の不在下でのCD40活性又は機能と比較して、CD40活性又は機能の低減を引き起こすアンタゴニスト抗体、又はその抗原結合部分である。特定の実施形態において、抗体、又はその抗原結合部分は、アゴニスト活性を実質的に含まない、すなわち、抗体、又はその抗原結合部分は、抗体、又はその抗原結合部分の不在下でのCD40活性又は機能と比較して、CD40活性又は機能の大きさを増加させない。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、又はその抗原結合部分である。

【0060】

ある特定の実施形態において、抗CD40抗体はルカツムマブ(Novartis; 米国特許第8277810号に記載されている通り); 抗体5D12、3A8及び3C6、又はそのヒト化バージョン(Novartis; 米国特許第5874082号に記載されている通り); 抗体15B8(Novartis; 米国特許第7445780号に記載されている通り); 抗体4D11(Kyowa Hakko Kirin; 米国特許第7193064号に記載されている通り); テレミキシマブ(temeliximab)(Bristol Myers Squibb; 米国特許第6051228号に記載されている通り); 抗体PG102(PanGenetics; 米国特許第8669352号に記載されている通り); 抗体2C10(Primateope; 米国特許第20140093497号に記載されている通り); 抗CD40抗体、米国特許第8591900号及び8778345号に記載されている通り(Boehringer Ingelheim); 抗CD40抗体、米国特許第5801227号に記載されている通り(Amgen); 又はAPX005(Boehringer Ingelheim; 米国特許出願公開第20120301488号に記載されている通り)である。

【0061】

ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号

10

20

30

40

50

9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域（CDR）を含む。

【0062】

ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。

【0063】

ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、米国公開第2016/0347850号に記載され、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む、全長抗体、Ab102である（CDR領域ボールド体で示されている；定常領域は下線が付けられている）。

【0064】

【表2】

表3:抗CD40抗体配列(Ab102)	
抗体領域	アミノ酸配列
ヒト Ab102-HC (重鎖)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKG LEWIA YISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR SWGYFDVW QGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKST <u>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC</u> <u>PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ</u> <u>VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS</u> <u>KLTVDKSRWQOGNVPFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (配列番号3)
ヒト Ab102-LC (軽鎖)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN KSSQSLLNRGNQKNYLTWFQQK PGQPPKLLI WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAV YYC QNDYTYPLTF GGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS <u>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS</u> <u>STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (配列番号4)
重鎖可変領域	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKG LEWIA YISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR SWGYFDVW QGTTVTVSS (配列番号5)
軽鎖可変領域	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN KSSQSLLNRGNQKNYLTWFQQK PGQPPKLLI WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAV YYC QNDYTYPLTF GGQGTKLEIK (配列番号6)
VH-CDR1	GFTFSDYGMN (配列番号7)
VH-CDR2	YISSGRGNIYYADTVKG (配列番号8)
VH-CDR3	SWGYFDV (配列番号9)
VL-CDR1	KSSQSLLNRGNQKNYLT (配列番号10)
VL-CDR2	WASTRES (配列番号11)
VL-CDR3	QNDYTYPLT (配列番号12)

【0065】

抗CD40抗体は、部分的な欠失又はいくつかのアミノ酸の置換若しくは単一アミノ酸の置換でも提供され得ることを認識されたい。例えば、CH2ドメインの選択された領域における単一アミノ酸の突然変異は、Fc結合を実質的に減少させるのに十分であり得る。同様に、エフェクター機能（例えば、補体C1Q結合）がモジュレートされるよう制御する1つ以上の定常領域ドメインのその部分を単に削除することが望ましいこともある。定常領域のこのような部分的な欠失は、対象の定常領域ドメインに伴う他の望ましい機能は無傷のまま、抗体の選択された特徴（血清半減期）を改善することができる。さらに、開示された抗体の定常領域は、生成する構造体のプロファイルを増強する1つ以上のアミノ酸の突然変異又は置換を介して修飾することができる。この観点において、抗体の立体配置及び免疫原性プロファイルを実質的に維持しながら、保存された結合部位（例えば、Fc結合）により提供される活性を破壊することは可能であり得る。ある特定の実施形態は、望ましい特徴を増強する、例えば、エフェクター機能を低減若しくは増加する、又はより多くのグルコシルチコイド受容体アゴニスト結合を提供するために、1つ以上のアミノ酸を定常領域に付加することを含むことができる。このような実施形態において、選択された定常領域ドメイン由来の特定の配列を挿入する又は繰り返すことが望ましいこともある。

10

【0066】

本開示は、本明細書で示された抗CD40抗体と実質的に同種である変化形及び同等物をさらに包含する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、すなわち、1つ以上のアミノ酸の類似のアミノ酸による置換を含有することができる。例えば、保存的置換は、アミノ酸を同じ一般的クラス内の別のアミノで置換する、例えば、1種の酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸で置換する、1種の塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸で置換する、又は1種の中性アミノ酸を別の中性のアミノ酸で置換することを指す。保存的アミノ酸置換により意図されることは当技術分野で周知である。

20

【0067】

抗CD40抗体は、抗体の組換え型ポリペプチド、天然ポリペプチド、又は合成ポリペプチドであることができる。本開示一部のアミノ酸配列は、タンパク質の構造又は機能の著しい作用なしに変化し得ることは当技術分野で認識されている。よって、本開示は、実質的な活性を示す、又は抗体の領域を含むポリペプチドの変化形をさらに含む。このような変異体は、欠失、挿入、反転、繰返し、及び型置換を含む。

30

【0068】

本明細書に記載されている抗CD40抗体は、当技術分野で公知の任意の適切な方法で生成することができる。このような方法は、直接的タンパク質合成法から、単離したポリペプチド配列をコードし、適切な変換した宿主においてこれらの配列を発現するDNA配列を構築するまでの範囲に及ぶ。一部の実施形態において、DNA配列は、組換え型の技術を使用して、目的の野生型タンパク質をコードしているDNA配列を単離又は合成することにより構築される。任意選択的に、部位特異的突然変異により突然変異が起きて、配列がその機能的類似体を提供することができる。例えば、Zoellerら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81巻：5662～5066頁（1984年）及び米国特許第4,588,585号を参照されたい。

40

【0069】

一部の実施形態において、抗CD40抗体をコードしているDNA配列は、オリゴヌクレオチドシンセサイザーを使用して化学合成により構築される。このようなオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、目的の組換え型ポリペプチドが生成される宿主細胞において好まれるようなコドンを選択して設計することができる。標準的方法は、目的の単離したポリペプチドをコードしている単離したポリヌクレオチド配列を合成するために適用され得る。

【0070】

ある特定の実施形態において、組換え型の発現ベクターは、抗体抗CD40抗体をコードしているDNAを増幅及び発現するために使用される。多種多様な発現宿主/ベクター

50

の組合せが利用され得る。真核生物宿主に対する有用な発現ベクターは、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス及びサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターを含む。細菌宿主に有用な発現ベクターとして、公知の細菌プラスミド、例えば、pCR1、pBR322、pMB9及びこれらの誘導体を含む、エシェリキア・コーライ (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド、幅広い宿主範囲のプラスミド、例えば、M13及び線維状一本鎖DNAファージが挙げられる。

【0071】

抗CD40抗体の発現に対して適切な宿主細胞として、適当なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母、昆虫又は高等真核細胞が挙げられる。原核生物として、グラム陰性又はグラム陽性生物、例えばE. コリ (*E. coli*) 又はE. バシラス (*E. bacilli*) が挙げられる。高等真核細胞として、哺乳動物の起源の樹立細胞系統が挙げられる。無細胞の翻訳システムもまた利用することができる。細菌、菌類、酵母、及び哺乳動物細胞宿主と共に使用するのに適当なクローニング及び発現ベクターはPouwelsら (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985年) により記載されている。抗体産生を含むタンパク質産生の方法に関する追加の情報は、例えば、米国特許公開第2008/0187954、米国特許第6,413,746及び6,660,501、及び国際特許公開WO04009823に見出すことができる。

【0072】

様々な哺乳動物又は昆虫細胞培養物システムもまた組換え型タンパク質を発現させるために有利に利用される。哺乳動物細胞における組換え型タンパク質の発現は、このようなタンパク質は一般的に正しく折り畳まれ、適切に修飾され、完全に機能的であるので、実施することができる。適切な哺乳動物の宿主細胞系統の例として、HEK-293及びHEK-293T、サル腎臓細胞のCOS-7系統 (Gluzman (*Cell* 123:175, 1981) により記載されている)、及び、例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、HeLa及びBHK細胞株を含む他の細胞株が挙げられる。哺乳動物の発現ベクターは、非転写要素、例えば、複製の起源、発現する遺伝子に連結された適切なプロモーター及び促進剤、並びに他の5'又は3'フランキング非転写配列、及び5'又は3'非変換配列、例えば、必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及び受容体部位、並びに転写停止配列を含むことができる。昆虫細胞における異種性タンパク質の産生のためのバキュロウイルスシステムはLuckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47巻 (1988年) により概説されている。

【0073】

変換された宿主により生産されるタンパク質は、任意の適切な方法により精製することができる。このような標準的方法として、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性及びサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解度、又はタンパク質精製のための任意の他の標準的技術が挙げられる。親和性タグ、例えば、ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザ被膜配列及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどをタンパク質に結合させて、適当な親和性カラムに通すことにより、容易な精製を可能にすることができる。単離タンパク質はまた、タンパク質分解、核磁気共鳴及びX線結晶構造解析などの技術を使用して物理的に特徴付けることもできる。

【0074】

細菌培養物中に産生された組換え型タンパク質は、例えば、細胞ペレットからの初期抽出、これに続く1回以上の濃縮、塩析、水性イオン交換又はサイズ排除クロマトグラフィーステップにより単離され得る。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、最終精製ステップに利用することができる。組換え型タンパク質の発現に利用した微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤の使用を含めた、任意の好都合な方法により破碎することができる。

【0075】

抗体を精製するための方法として、例えば、米国特許公開第 2 0 0 8 / 0 3 1 2 4 2 5 号、第 2 0 0 8 / 0 1 7 7 0 4 8 号、及び第 2 0 0 9 / 0 1 8 7 0 0 5 号に記載されているものなどが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

II . グルココルチコイド受容体アゴニストに連結した抗 CD 4 0 抗体

抗 CD 4 0 抗体に連結したグルココルチコイド受容体アゴニストを含む抗体薬物コンジュゲート (ADC) が本明細書で提供される。一部の実施形態において、ADC は Fc ガンマ受容体に結合する。一部の実施形態において、ADC は Jurkat 細胞リポーターアッセイにおいて活性がある。一部の実施形態において、ADC は CD 4 0 リポーターアッセイにおいて活性がある。一部の実施形態において、ADC は、抗 CD 4 0 抗体単独の場合と比較して、免疫原性の減少を示す (抗薬物免疫応答 (ADA) の減少)。

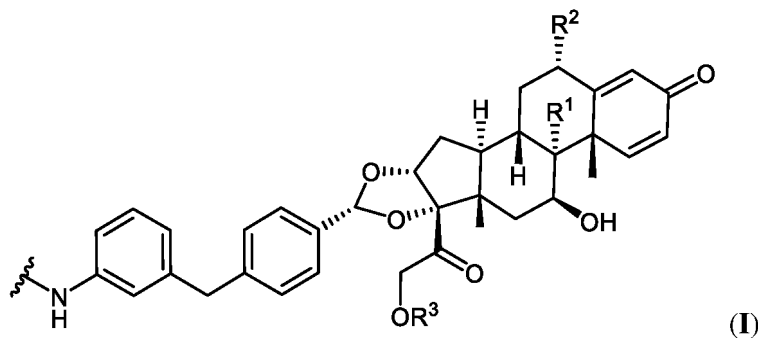
10

【 0 0 7 7 】

一実施形態において、(a) 抗 CD 4 0 抗体 ; 及び (b) 式 (I) のグルココルチコイド受容体アゴニストの基 :

【 0 0 7 8 】

【 化 7 】



20

(式中、

R^1 は、水素又はフルオロであり、

R^2 は、水素又はフルオロであり、

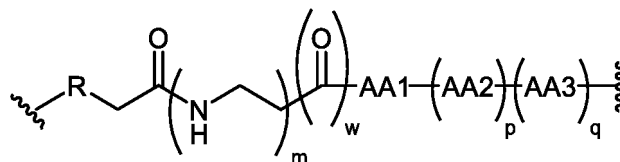
R^3 は、水素又は $-P(=O)(OH)_2$ である。) を含む抗体薬物コンジュゲートであ

30

って、
さらに、抗体が、式のリンカー :

【 0 0 7 9 】

【 化 8 】

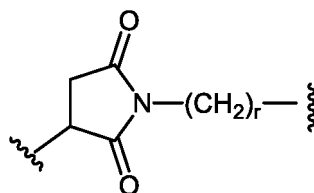


(式中、R は、結合、

40

【 0 0 8 0 】

【 化 9 】

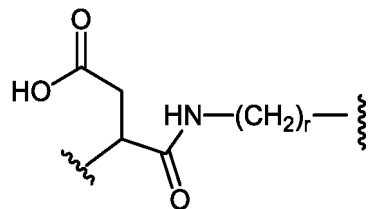


又は

【 0 0 8 1 】

50

【化 1 0】



(式中、 r は 0 又は 1 である。) であり、

AA1、AA2、及び AA3 は、独立して、アラニン (Ala)、グリシン (Gly)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、プロリン (Pro)、バリン (Val)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、アルギニン (Arg)、ヒスチジン (His)、リシン (Lys)、セリン (Ser)、スレオニン (Thr)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、アスパラギン (Asn)、及びグルタミン (Gln) からなる群から選択され、

m は 0 又は 1 であり、

w は 0 又は 1 であり、

p は 0 又は 1 であり、

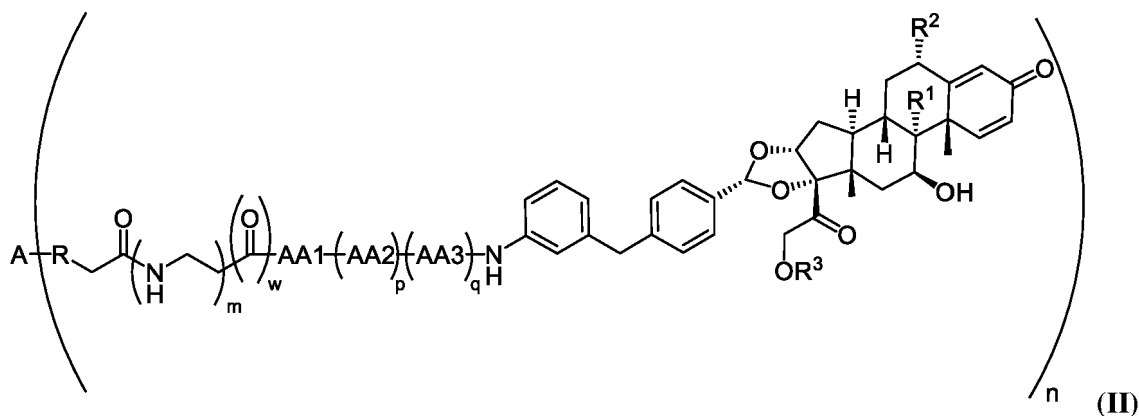
q は 0 又は 1 である。) により、グルココルチコイド受容体アゴニストにコンジュゲートしている抗体薬物コンジュゲートが提供される。

【0082】

別の実施形態において、式 (II) の抗体薬物コンジュゲートが提供される：

【0083】

【化 1 1】



(式中、

A は抗 CD40 抗体であり、

n は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である。)

【0084】

ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 として示された相補性決定領域 (CDR) を含む。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 5 として示された重鎖可変領域及び配列番号 6 として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 3 として示された重鎖及び配列番号 4 として示された軽鎖を含む。

【0085】

抗体は、求核性基、例えば、OH 基 (連結した場合、-O-基を提供する)、-SH 基 (連結した場合、-S-基を提供する)、又は -NH₂ 基 (連結した場合、-NH-基を提供する) を保持する抗体上の任意の部分により変数 R に連結していてもよい。ある特定

の実施形態において、抗体の変数 R への結合点は、抗体のシステイン残基の S H 基（連結した場合、- S - 基を提供する）を介する。

【0086】

ある特定の実施形態において、 R^1 は水素であり、 R^2 は水素である。

【0087】

ある特定の実施形態において、 R^1 はフルオロであり、 R^2 は水素である。

【0088】

ある特定の実施形態において、 R^1 はフルオロであり、 R^2 はフルオロである。

【0089】

ある特定の実施形態において、 R^3 は水素である。

10

【0090】

ある特定の実施形態において、 R^3 は - P (= O) (OH) ₂ である。

【0091】

ある特定の好ましい実施形態において、 R^1 及び R^2 の少なくとも 1 つはフルオロであり、 R^3 は - P (= O) (OH) ₂ である。

【0092】

ある特定の実施形態において、- AA 1 - (AA 2) _p - (AA 3) _q - は、- Gly - Glu - ; - Ala - Ala - ; - Glu - Ala - Ala - ; - Gly - Lys - ; - Glu - ; - Glu - Ser - Lys - ; 及び - Gly - Ser - Lys - からなる群から選択される。このアミノ酸リストは、左から右に読み取るべきであり、左端のアミノ酸は AA 1 に対応し、右端のアミノ酸は AA 2 (q が 0 の場合)、又は AA 3 (q が 1 の場合) に対応すると理解されたい。

20

【0093】

ある特定の好ましい実施形態において、リンカー部分は、1、2、又は 3 種の親水性アミノ酸 - AA 1 - (AA 2) _p - (AA 3) _q - を含む、例えば、AA 1、AA 2、及び / 又は AA 3 の側鎖は、水素結合基、例えば = O、及び / 又は水素供与基、例えば、- OH、- NH ₂、又は - SH を含む。リンカーの親水性を増加させることは、長期安定性及び ADC の貯蔵をもたらし得る。例えば、ある特定の好ましい実施形態において、- AA 1 - (AA 2) _p - (AA 3) _q - は、- Gly - Glu - ; - Gly - Lys - ; - Glu - Ser - Lys - ; 及び - Gly - Ser - Lys - からなる群から選択される。

30

【0094】

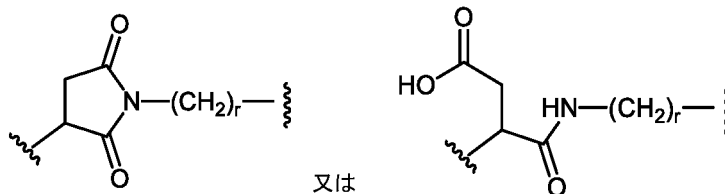
ある特定の実施形態において、m が 0 である場合、w は 0 である。ある特定の実施形態において、m が 1 である場合、w は 1 である。

【0095】

ある特定の実施形態において、m は 0 であり、q は 0 であり、R は

【0096】

【化 1 2】



40

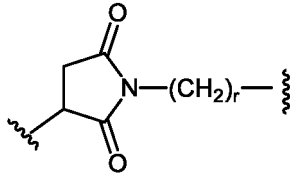
(式中、r は 0 又は 1 である。) である。ある特定の実施形態において、w は 0 である。ある特定の実施形態において、r は 0 である。ある特定の実施形態において、r は 1 である。

【0097】

ある特定の好ましい実施形態において、R は結合である。式

【0098】

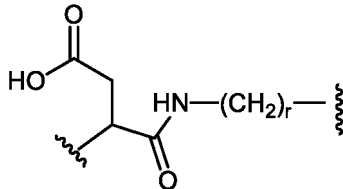
【化 1 3】



の R 基を含む A D C はインピボで不安定であり得る。式

【 0 0 9 9】

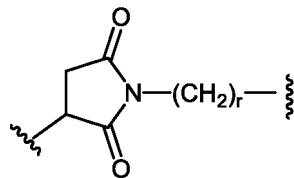
【化 1 4】



の環開した R 基を含む A D C は式

【 0 1 0 0】

【化 1 5】



の基に対して、液体賦形剤中での長期貯蔵の間に閉環し得る。さらに、閉環した A D C から環開した A D C を調製することは、長期間の間塩基性 p H 条件を必要とし得るので、より長い製造時間及びより高い製造コスト、並びに高い p H による所望しない A D C の分解をもたらし得る。

【 0 1 0 1】

ある特定の実施形態において、m は 0 又は 1 であり、p は 1 であり、R は結合である。ある特定の実施形態において、w は 0 である。ある特定の実施形態において q は 0 である。ある特定の実施形態において、q は 1 である。

30

【 0 1 0 2】

ある特定の実施形態において、m は 1 であり、q は 0 である。ある特定の実施形態において、w は 1 である。ある特定の実施形態において、m は 1 であり、w は 1 である。ある特定の実施形態において、m は 1 であり、w は 1 であり、q は 0 である。

【 0 1 0 3】

ある特定の実施形態において、m は 0 である。

【 0 1 0 4】

ある特定の好ましい実施形態において、p は 1 である。ある特定の好ましい実施形態において、p は 1 であり、m は 0 である。ある特定の好ましい実施形態において、p は 1 であり、m は 0 であり、w は 0 である。ある特定の好ましい実施形態において、p は 1 であり、m は 0 であり、w は 0 であり、q は 0 であり、R は結合である。ある特定の代替の好ましい実施形態において、p は 1 であり、m は 0 であり、w は 0 であり、q は 1 であり、R は結合である。

40

【 0 1 0 5】

ある特定の実施形態、式 (I) の基を含む抗体薬物コンジュゲートにおいて、薬剤含有量は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 である。ある特定の実施形態において、薬剤含有量は 2、3、4、5、6、7、又は 8 である。別の実施形態において、薬剤含有量は 1、2、3、4、又は 5 である。別の実施形態において、薬剤含有量は 2、3、

50

4、又は5である。別の実施形態において、薬剤含有量は2、4、6、又は8である。別の実施形態において、薬剤含有量は1である。別の実施形態において、薬剤含有量は2である。別の実施形態において、薬剤含有量は3である。別の実施形態において、薬剤含有量は4である。別の実施形態において、薬剤含有量は5である。別の実施形態において、薬剤含有量は6である。別の実施形態において、薬剤含有量は7である。別の実施形態において、薬剤含有量は8である。好ましい実施形態において、薬剤含有量は2又は4である。

【0106】

式(I I)のある特定の実施形態において、nは2、3、4、5、6、7、又は8である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは1、2、3、4、又は5である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは2、3、4、又は5である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは2、4、6、又は8である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは1である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは2である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは3である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは4である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは5である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは6である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは7である。式(I I)のある特定の実施形態において、nは8である。式(I I)の好ましい実施形態において、nは2又は4である。

10

【0107】

上記記載されている実施形態の様々な組合せが本明細書でさらに想定される。

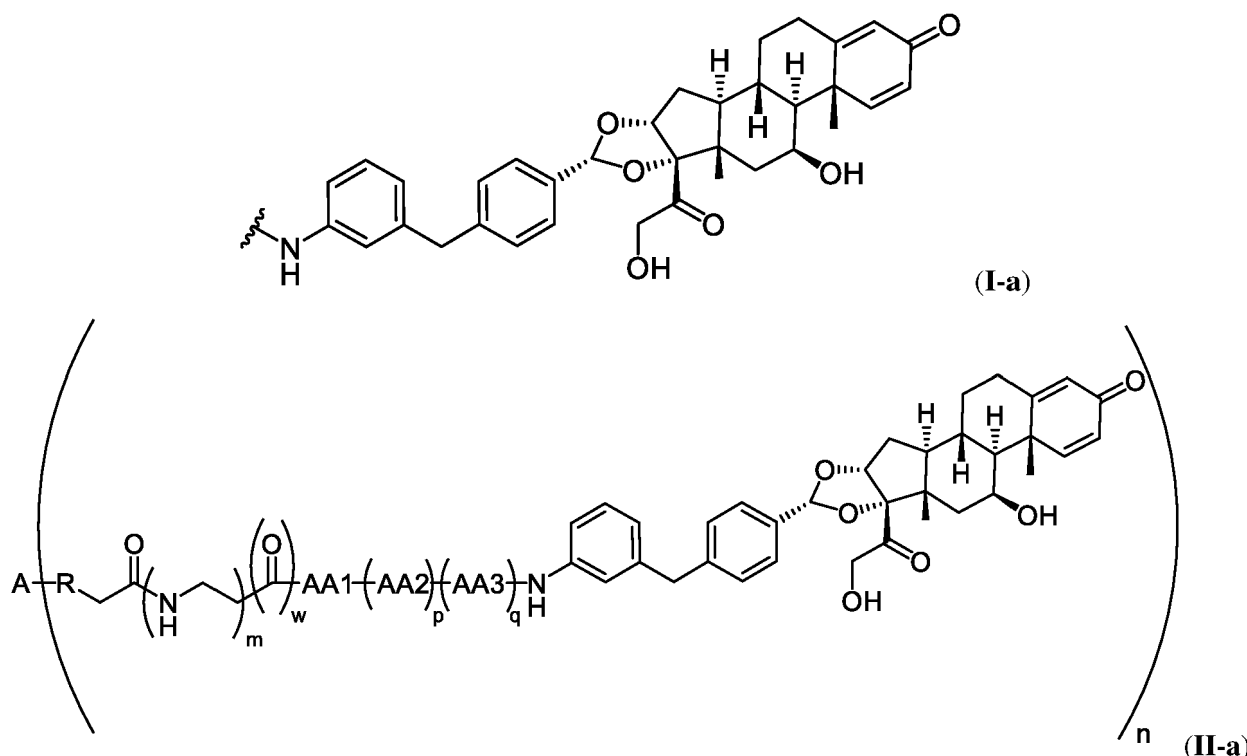
20

【0108】

例えば、 R^1 が水素であり、 R^2 が水素であり、 R^3 が水素である、ある特定の実施形態において、式(I - a)の基を含む抗体薬物コンジュゲート、又は式(I I - a)の抗体薬物コンジュゲート：

【0109】

【化16】



30

40

が提供される。

【0110】

ある特定の実施形態において、Rは結合である。ある特定の実施形態において、Rは結

50

合であり、 m は1であり、 p は1であり、 q は0である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は1であり、 p は1であり、 q は0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ；及び $-Gly-Lys-$ からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0又は1である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0又は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ； $-Glu-Ala-Ala-$ ； $-Gly-Lys-$ ； $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ からなる群から選択される。しかし、ある特定の実施形態において、 $-Ala-Ala-$ 及び $-Glu-Ala-Ala-$ は除外される。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Gly-Glu-$ 又は $-Gly-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、 m が0である場合、 w は0である。ある特定の実施形態において、 m が1である場合、 w は1である。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域(CDR)を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、 n は2である。ある特定の実施形態において、 n は4である。

10

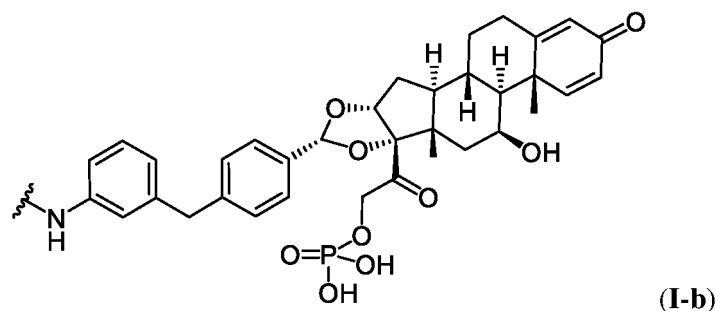
20

【0111】

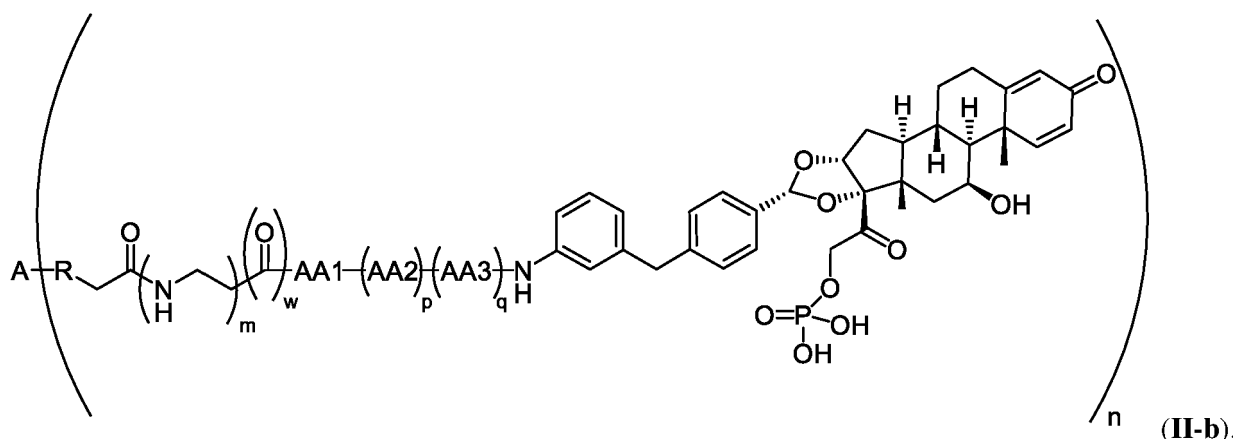
R^1 が水素であり、 R^2 が水素であり、 R^3 が $-P(=O)(OH)_2$ である、ある特定の実施形態において、式(I-b)の基を含む抗体薬物コンジュゲート、又は式(II-b)の抗体薬物コンジュゲートが提供される。

【0112】

【化17】



30



40

【0113】

ある特定の実施形態において、 R は結合である。ある特定の実施形態において、 R は結

50

合であり、 m は1であり、 p は1であり、 q は0である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は1であり、 p は1であり、 q は0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ；及び $-Gly-Lys-$ からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0又は1である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0又は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ； $-Glu-Ala-Ala-$ ； $-Gly-Lys-$ ； $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ からなる群から選択される。しかし、ある特定の実施形態において、 $-Ala-Ala-$ 及び $-Glu-Ala-Ala-$ は除外される。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Gly-Glu-$ 又は $-Gly-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、 m が0である場合、 w は0である。ある特定の実施形態において、 m が1である場合、 w は1である。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域(CDR)を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、 n は2である。ある特定の実施形態において、 n は4である。

10

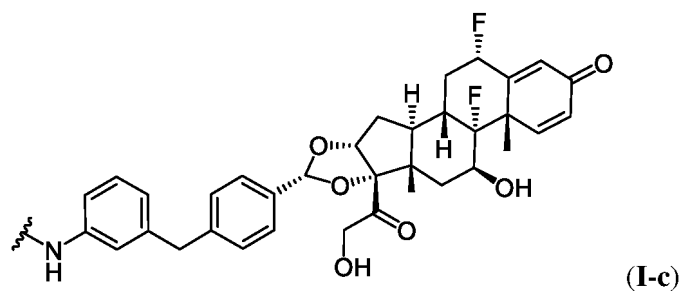
20

【0114】

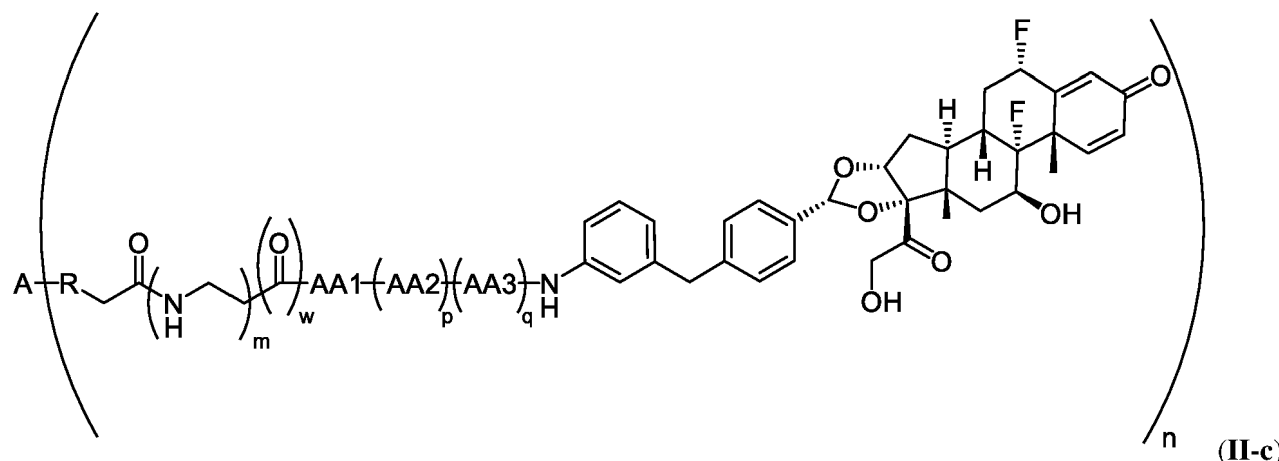
R^1 がフルオロであり、 R^2 がフルオロであり、 R^3 が水素である、ある特定の実施形態において、式(I-c)の基を含む抗体薬物コンジュゲート、又は式(II-c)の抗体薬物コンジュゲートが提供される。

【0115】

【化18】



30



40

【0116】

ある特定の実施形態において、 R は結合である。ある特定の実施形態において、 R は結

50

合であり、 m は1であり、 p は1であり、 q は0である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は1であり、 p は1であり、 q は0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ；及び $-Gly-Lys-$ からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0又は1である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0又は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ； $-Glu-Ala-Ala-$ ； $-Gly-Lys-$ ； $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ からなる群から選択される。しかし、ある特定の実施形態において、 $-Ala-Ala-$ 及び $-Glu-Ala-Ala-$ は除外される。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Gly-Glu-$ 又は $-Gly-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、 R は結合であり、 m は0であり、 p は1であり、 q は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、 m が0である場合、 w は0である。ある特定の実施形態において、 m が1である場合、 w は1である。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域(CDR)を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、 n は2である。ある特定の実施形態において、 n は4である。

10

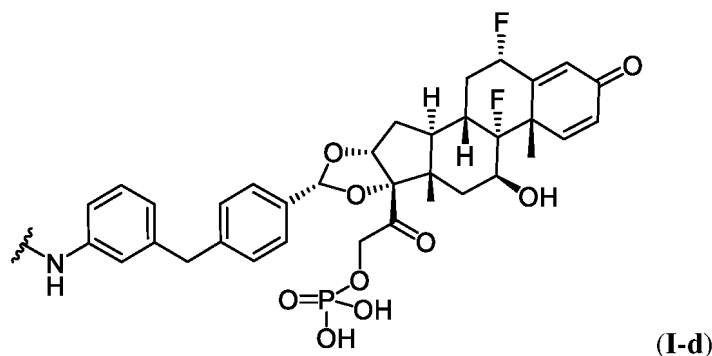
20

【0117】

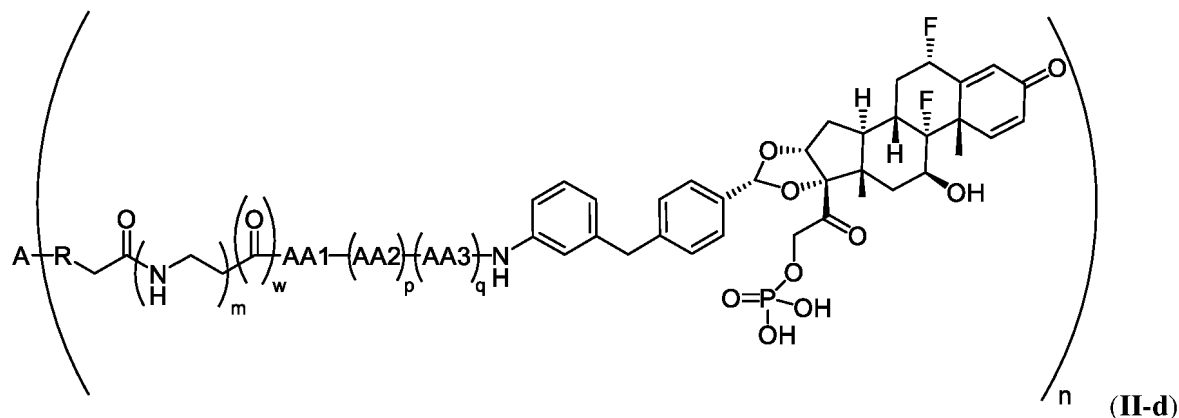
R^1 がフルオロであり、 R^2 がフルオロであり、 R^3 が $-P(=O)(OH)_2$ である、ある特定の実施形態において、式(I-d)の基を含む抗体薬物コンジュゲート、又は式(II-d)の抗体薬物コンジュゲートが提供される。

【0118】

【化19】



30



40

【0119】

50

ある特定の実施形態において、Rは結合である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは1であり、pは1であり、qは0である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは1であり、pは1であり、qは0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ；及び $-Gly-Lys-$ からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0又は1である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0又は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ； $-Glu-Ala-Ala-$ ； $-Gly-Lys-$ ； $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ からなる群から選択される。しかし、ある特定の実施形態において、 $-Ala-Ala-$ 及び $-Glu-Ala-Ala-$ は除外される。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Gly-Glu-$ 又は $-Gly-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、mが0である場合、wは0である。ある特定の実施形態において、mが1である場合、wは1である。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域(CDR)を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、nは2である。ある特定の実施形態において、nは4である。

10

20

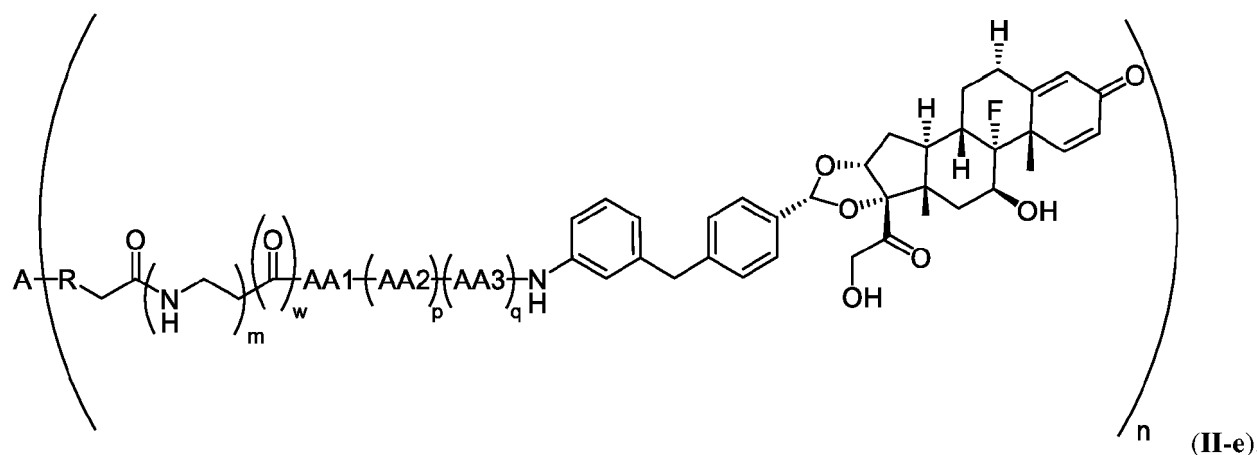
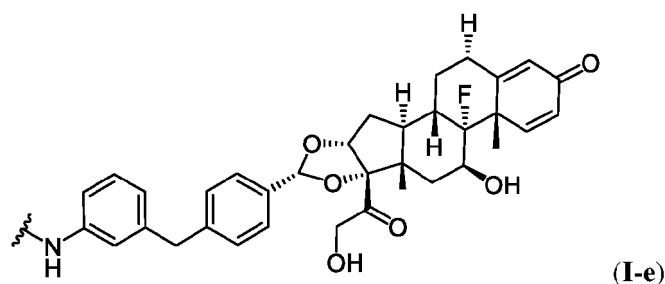
【0120】

R^1 がフルオロであり、 R^2 が水素であり、 R^3 が水素である、ある特定の実施形態において、式(I-e)の基を含む抗体薬物コンジュゲート又は式(II-e)の抗体薬物コンジュゲートが提供される。

【0121】

【化20】

30



40

【0122】

50

ある特定の実施形態において、Rは結合である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは1であり、pは1であり、qは0である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは1であり、pは1であり、qは0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ；及び $-Gly-Lys-$ からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0又は1である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0又は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ； $-Glu-Ala-Ala-$ ； $-Gly-Lys-$ ； $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ からなる群から選択される。しかし、ある特定の実施形態において、 $-Ala-Ala-$ 及び $-Glu-Ala-Ala-$ は除外される。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Gly-Glu-$ 又は $-Gly-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、mが0である場合、wは0である。ある特定の実施形態において、mが1である場合、wは1である。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域(CDR)を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、nは2である。ある特定の実施形態において、nは4である。

10

20

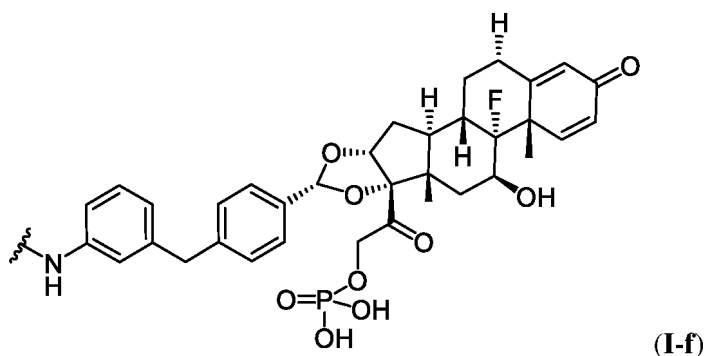
【0123】

R^1 がフルオロであり、 R^2 が水素であり、 R^3 が $-P(=O)(OH)_2$ である、ある特定の実施形態において、式(I-f)の基を含む抗体薬物コンジュゲート、又は式(II-f)抗体薬物コンジュゲートが提供される。

【0124】

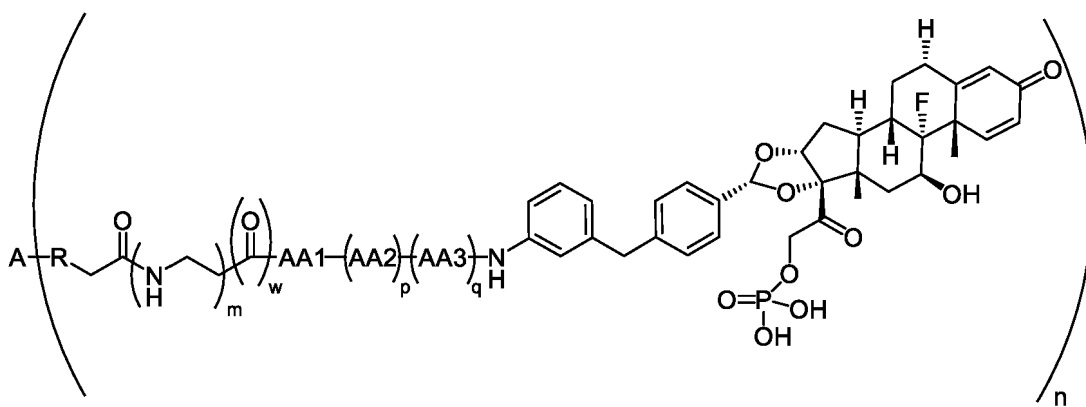
【化21】

30



(I-f)

40



(II-f).

50

【 0 1 2 5 】

ある特定の実施形態において、Rは結合である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは1であり、pは1であり、qは0である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは1であり、pは1であり、qは0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ；及び $-Gly-Lys-$ からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0又は1である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0又は1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は、 $-Gly-Glu-$ ； $-Ala-Ala-$ ； $-Glu-Ala-Ala-$ ； $-Gly-Lys-$ ； $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ からなる群から選択される。しかし、ある特定の実施形態において、 $-Ala-Ala-$ 及び $-Glu-Ala-Ala-$ は除外される。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは0であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Gly-Glu-$ 又は $-Gly-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、Rは結合であり、mは0であり、pは1であり、qは1であり、 $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ は $-Glu-Ser-Lys-$ ；及び $-Gly-Ser-Lys-$ である。ある特定の実施形態において、mが0である場合、wは0である。ある特定の実施形態において、mが1である場合、wは1である。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12として示された相補性決定領域(CDR)を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号5として示された重鎖可変領域及び配列番号6として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗CD40抗体は、配列番号3として示された重鎖及び配列番号4として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、nは2である。ある特定の実施形態において、nは4である。

10

20

【 0 1 2 6 】

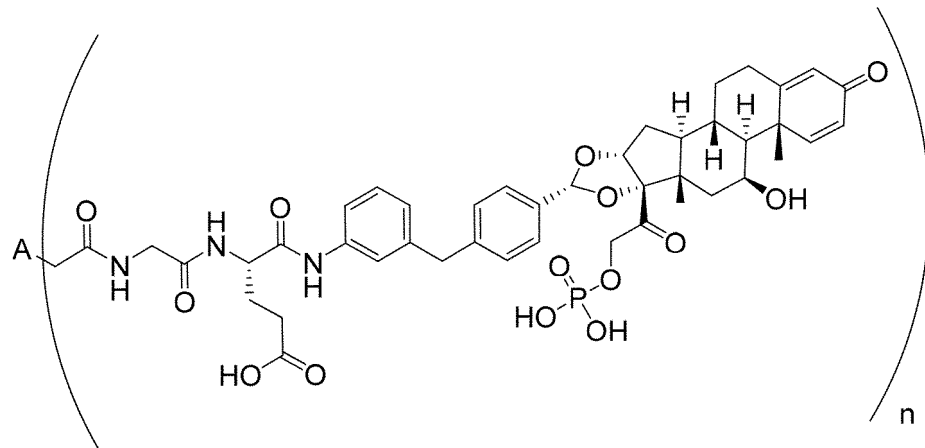
式(I)の基を含む例示的な抗体薬物コンジュゲート、及び式(II)の抗体薬物コンジュゲートは、表5、6A、及び6Bに列挙された抗体薬物コンジュゲート(式中、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10であり、Aは抗CD40抗体である。)を含む。

【 0 1 2 7 】

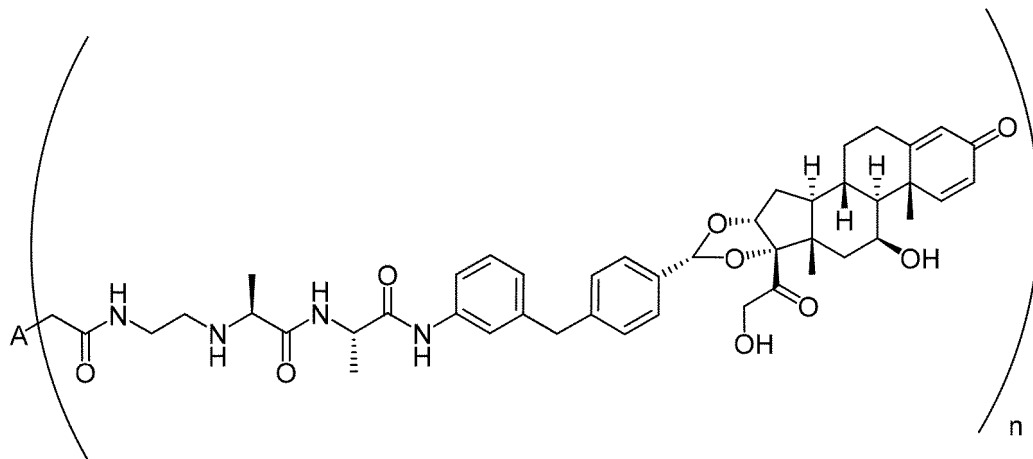
30

【表 3】

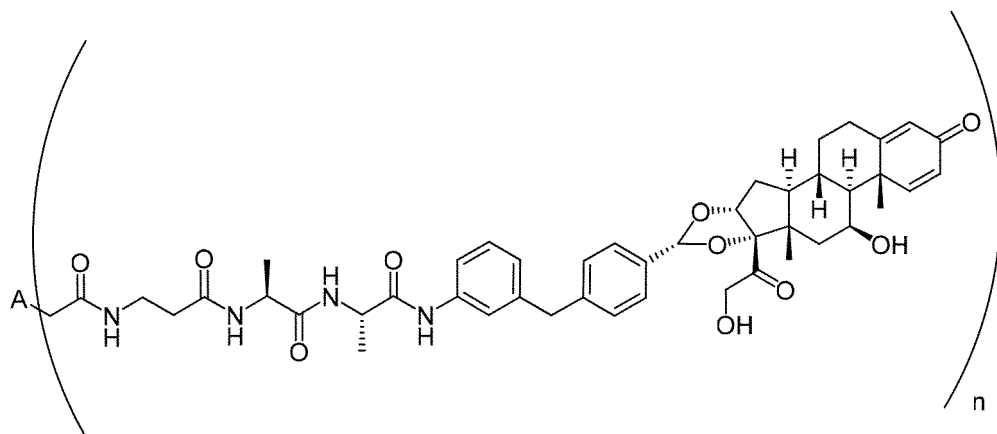
表5. コンjugateしたADC



実施例4-コンjugate型



実施例14A-コンjugate型



実施例14B-コンjugate型

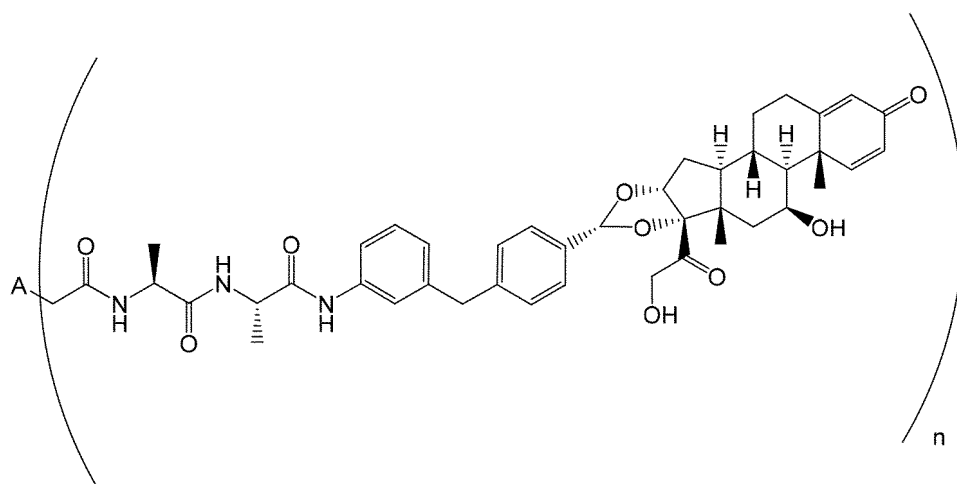
10

20

30

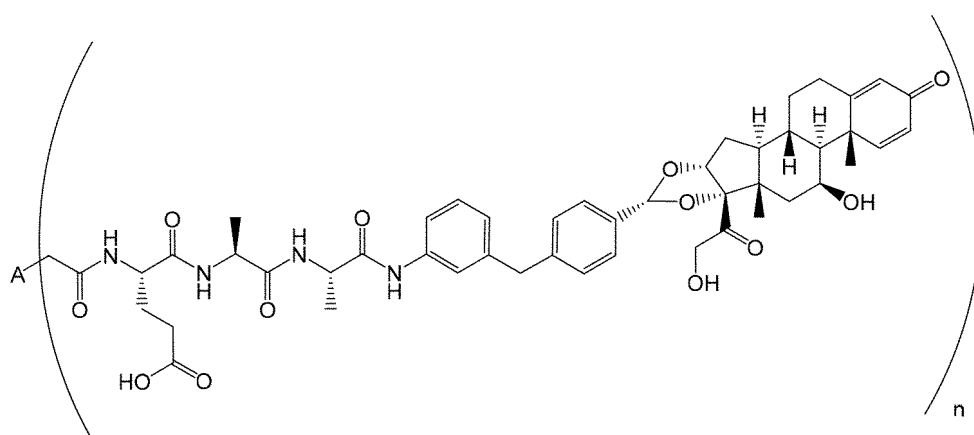
40

表5. コンジュゲートしたADC



10

実施例 15-コンジュゲート型

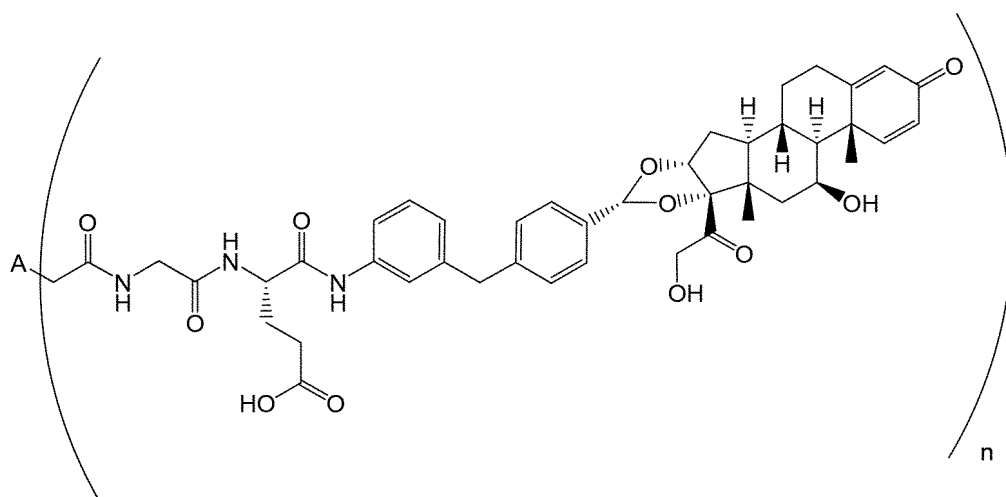


20

実施例 16-コンジュゲート型

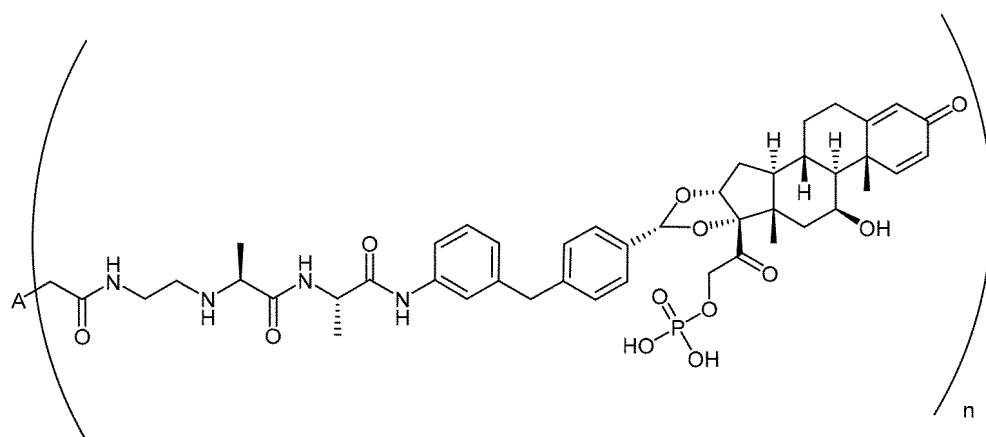
30

表5. コンジュゲートしたADC



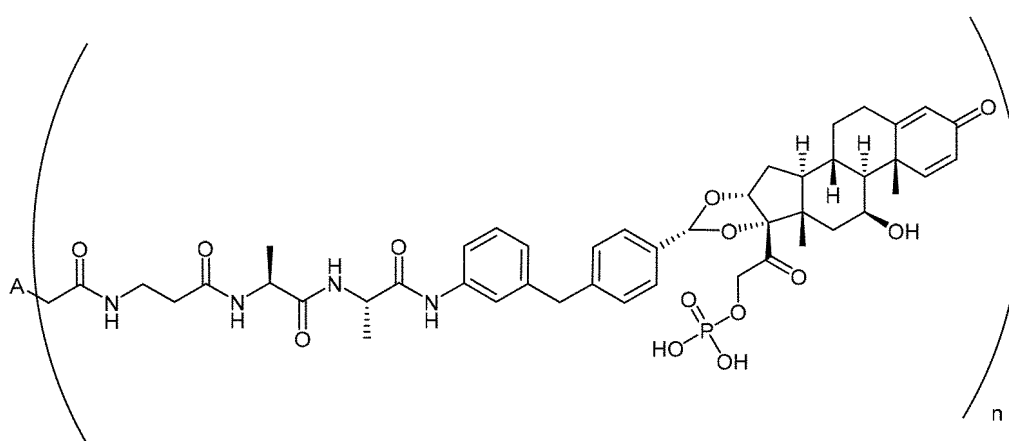
10

実施例 17-コンジュゲート型



20

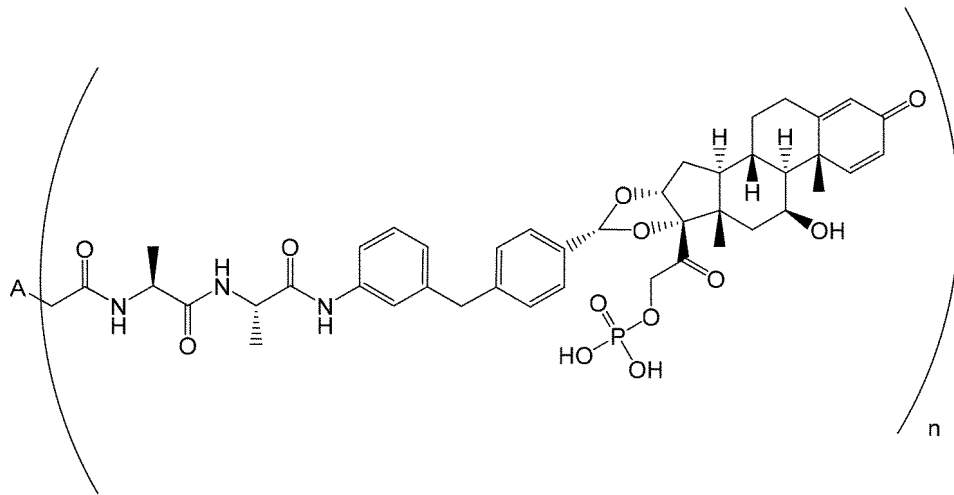
実施例 18A-コンジュゲート型



40

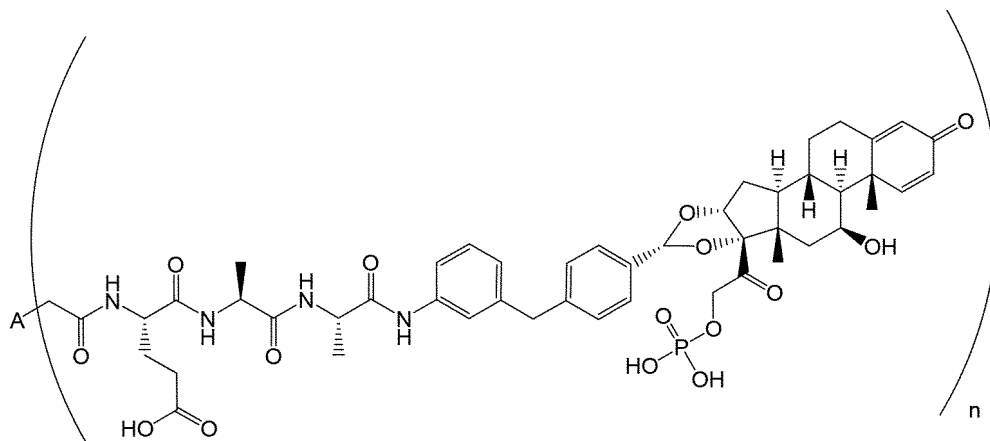
実施例 18B-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートした ADC



10

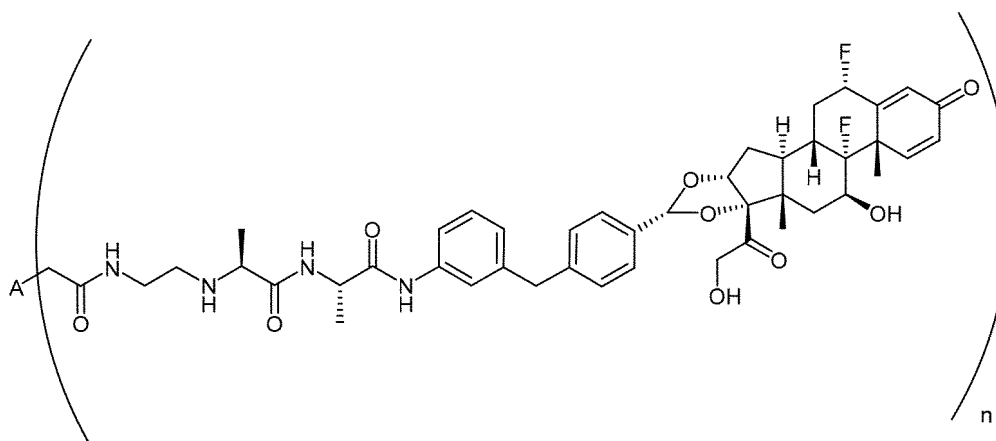
実施例 19-コンジュゲート型



20

30

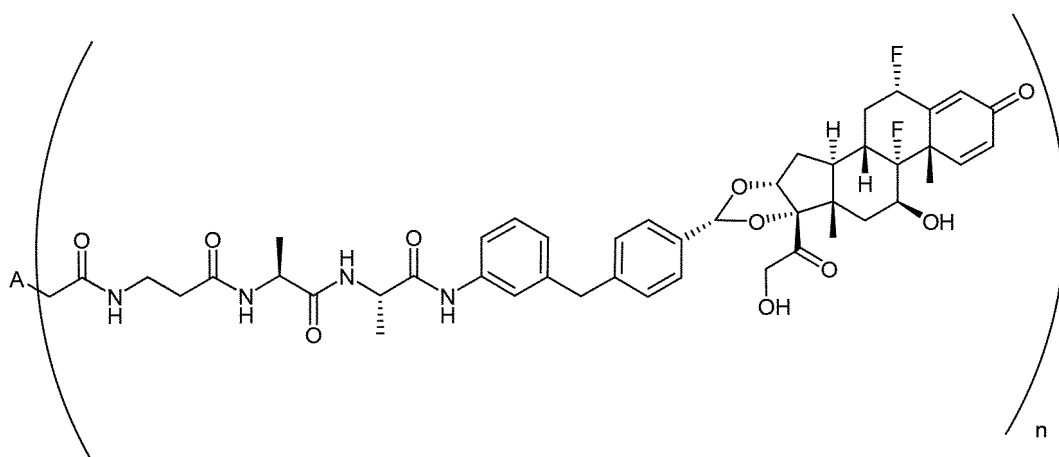
実施例 20-コンジュゲート型



40

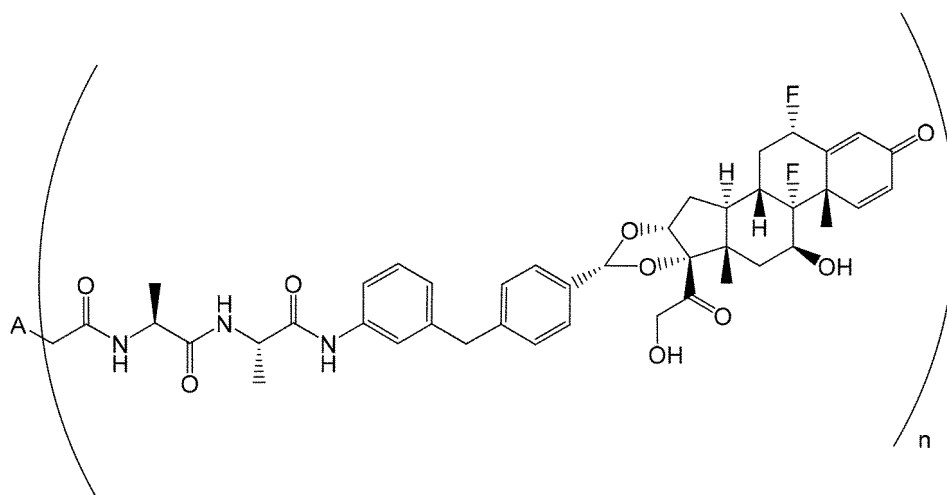
実施例 21A-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC



10

実施例 21B-コンジュゲート型

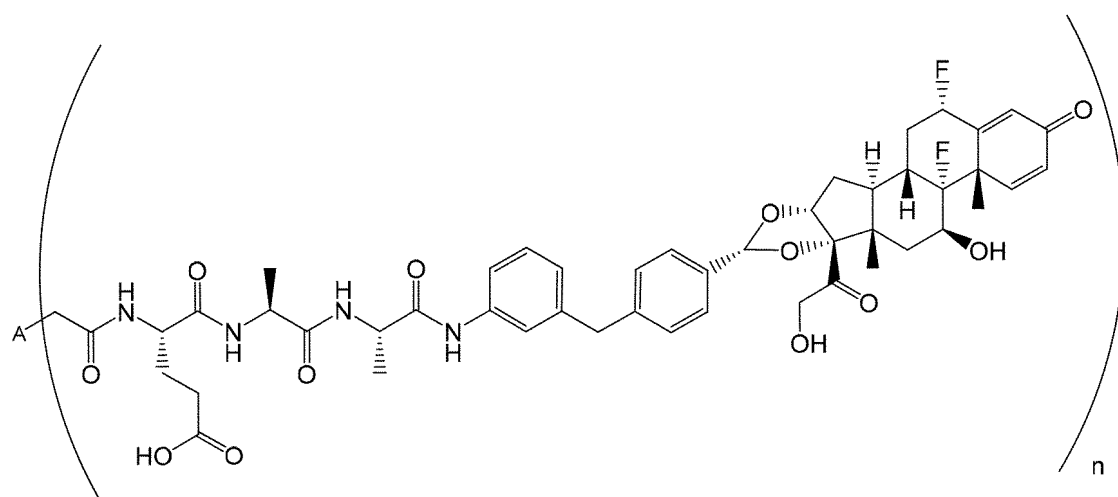


20

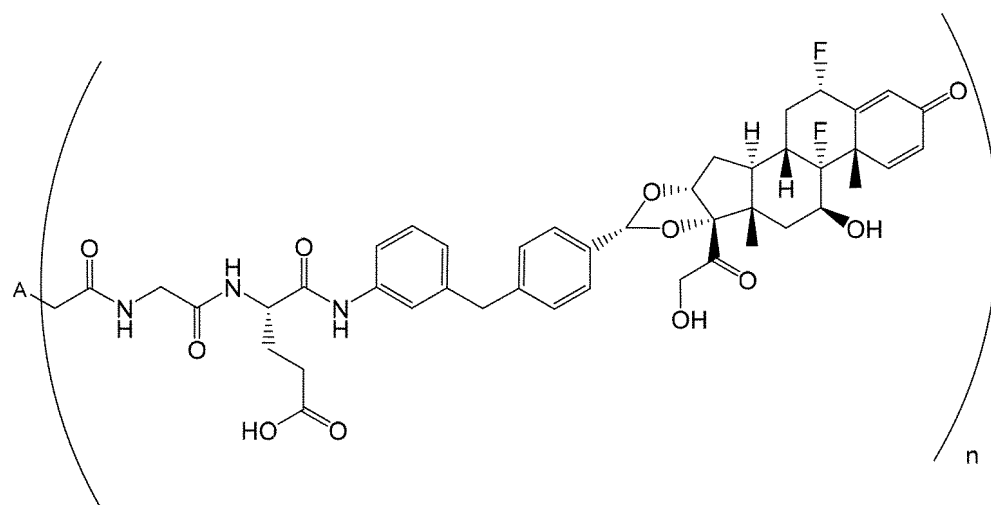
30

実施例 22-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC

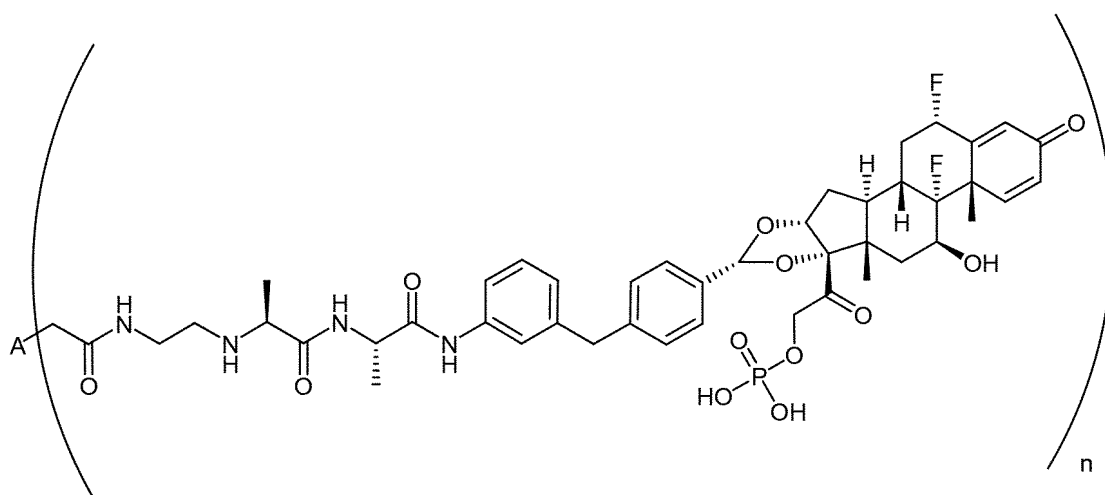


実施例 23-コンジュゲート型

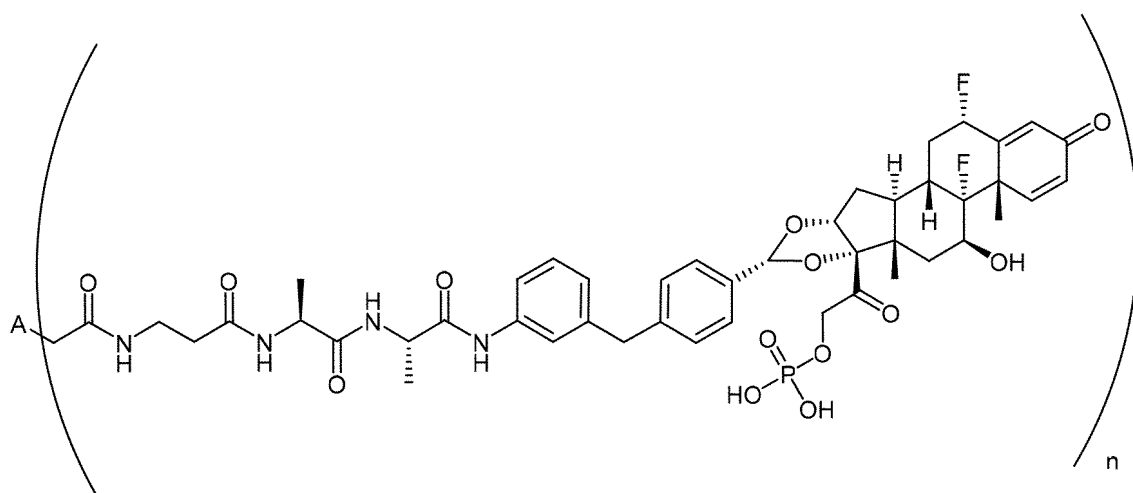


実施例 24-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC

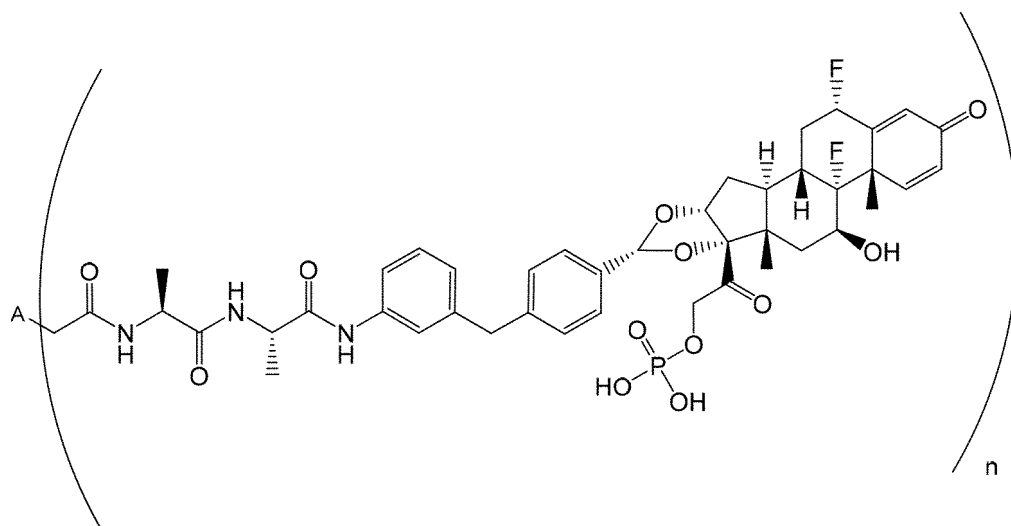


実施例 25A-コンジュゲート型



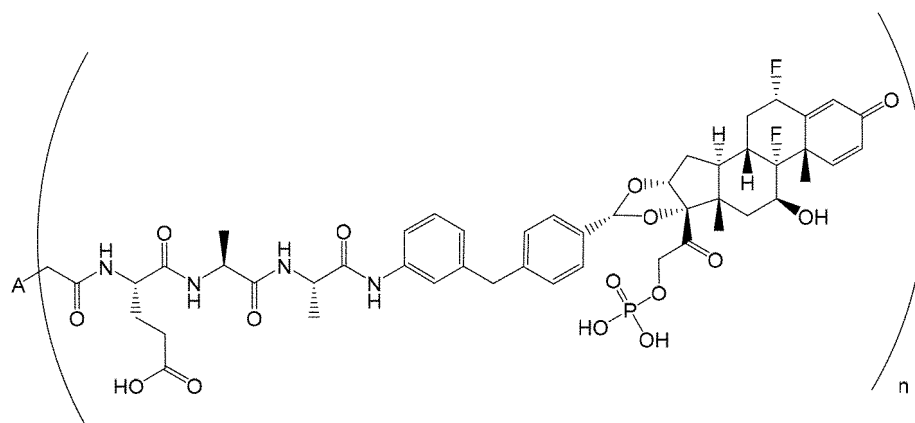
実施例 25B-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC



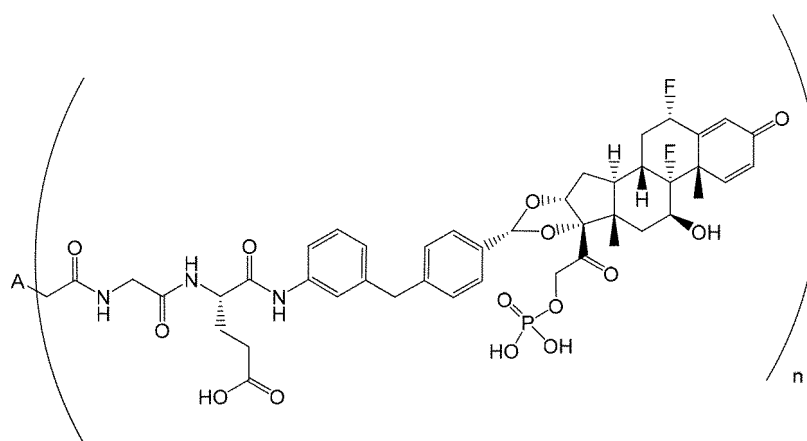
10

実施例 26-コンジュゲート型



20

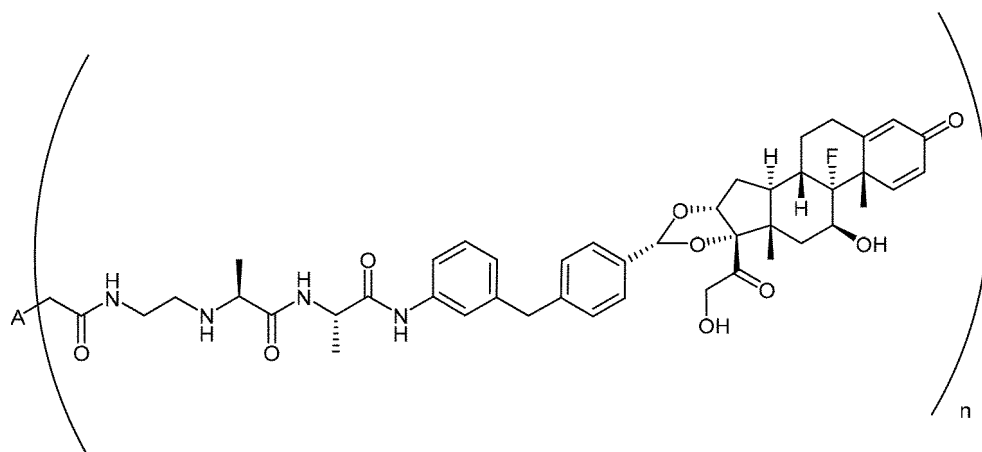
実施例 27-コンジュゲート型



40

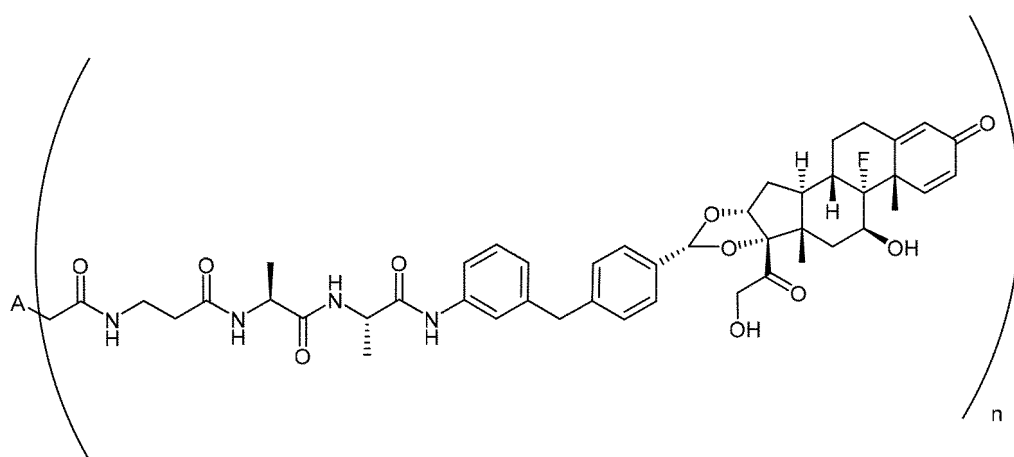
実施例 28-コンジュゲート型

表 5. コンジュゲートした ADC



10

実施例 29A-コンジュゲート型

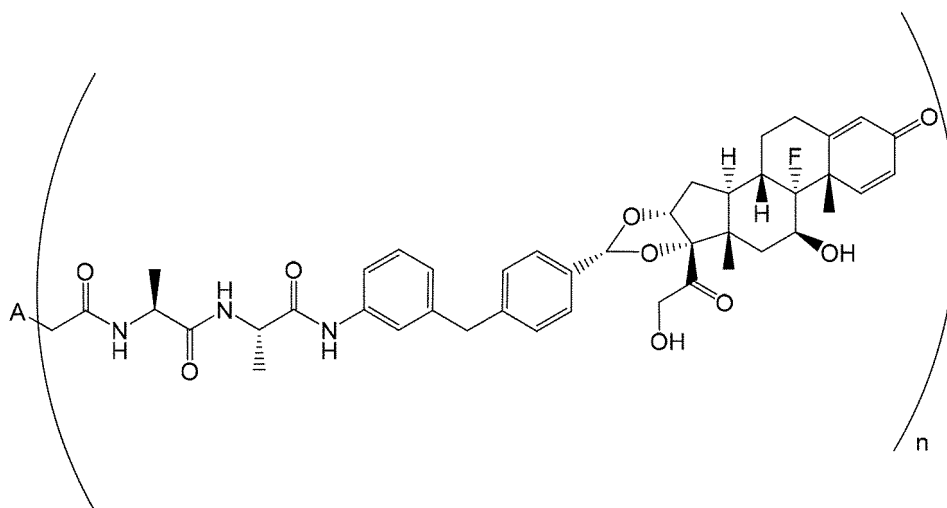


20

実施例 29B-コンジュゲート型

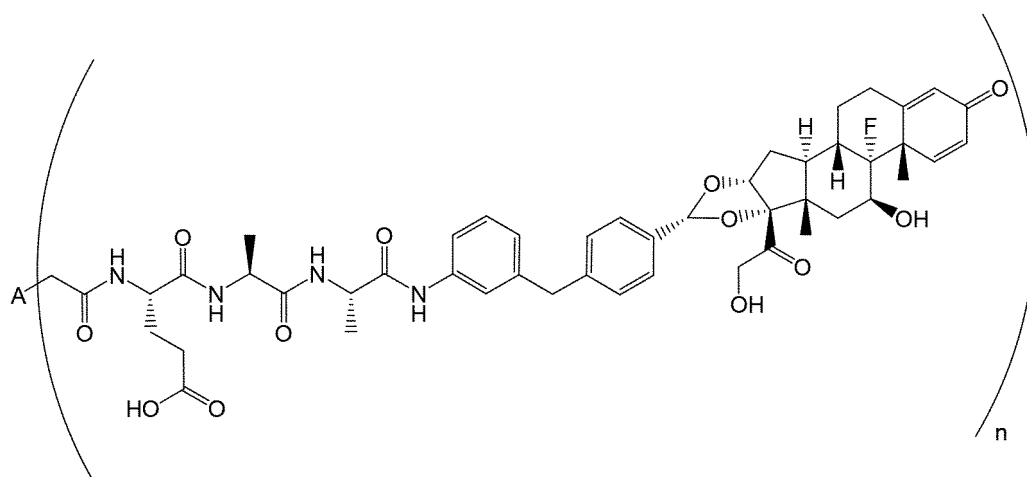
30

表 5. コンジュゲートした ADC



10

実施例 30-コンジュゲート型

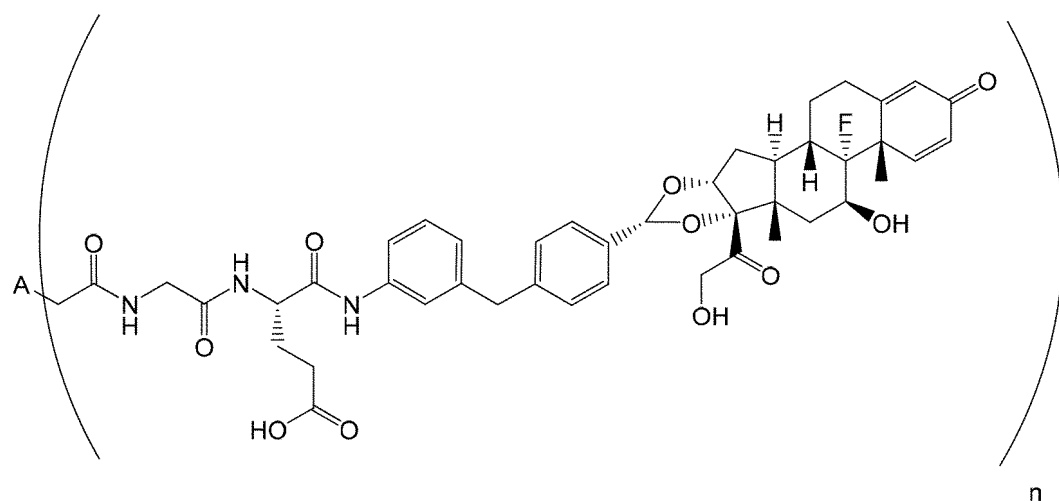


20

30

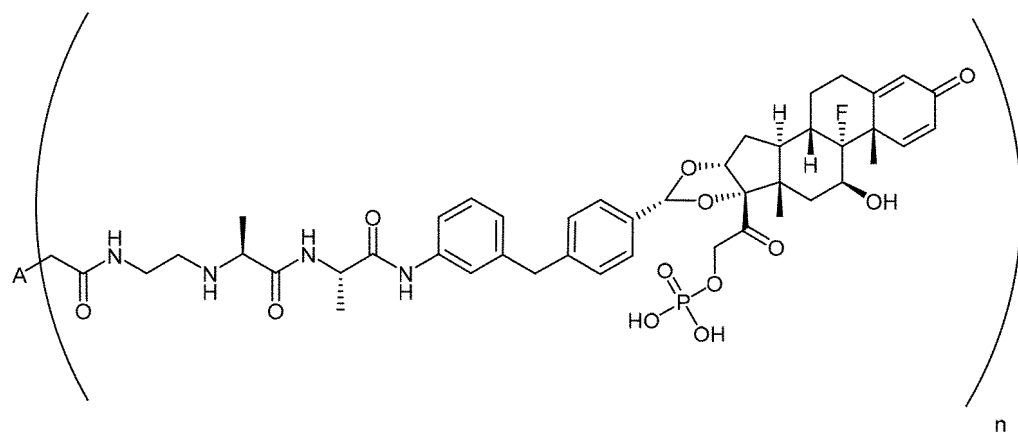
実施例 31-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC



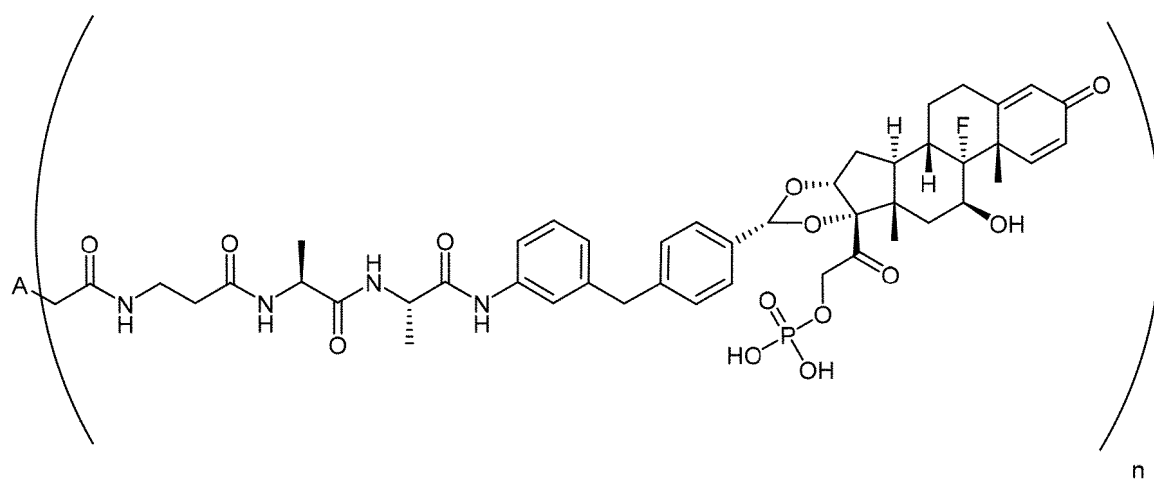
10

実施例 32-コンジュゲート型



20

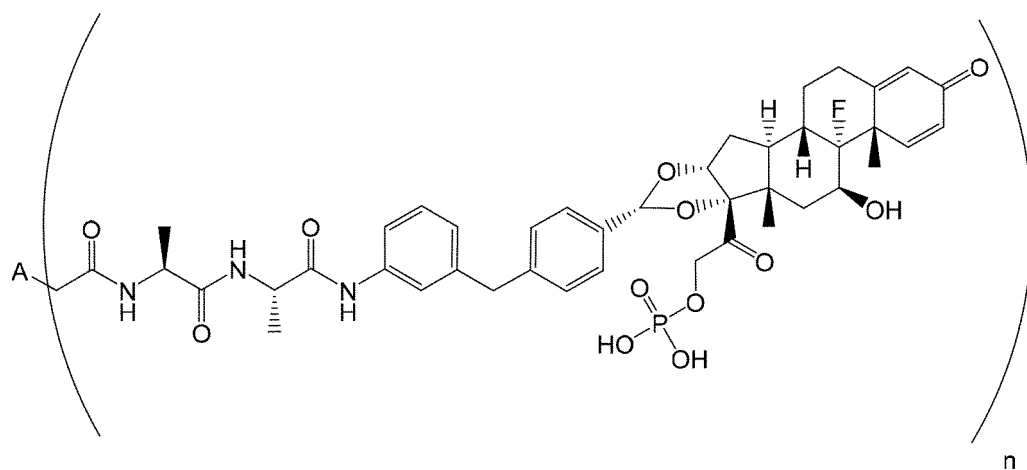
実施例 33A-コンジュゲート型



40

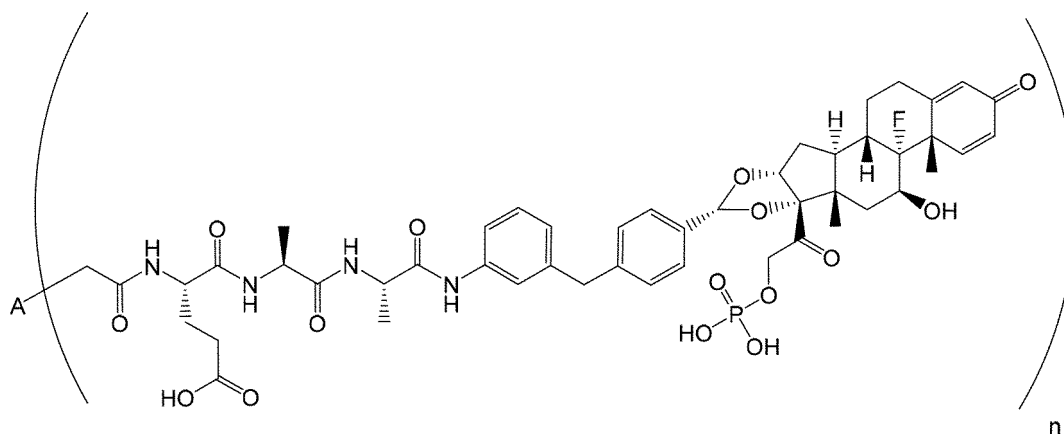
実施例 33B-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC



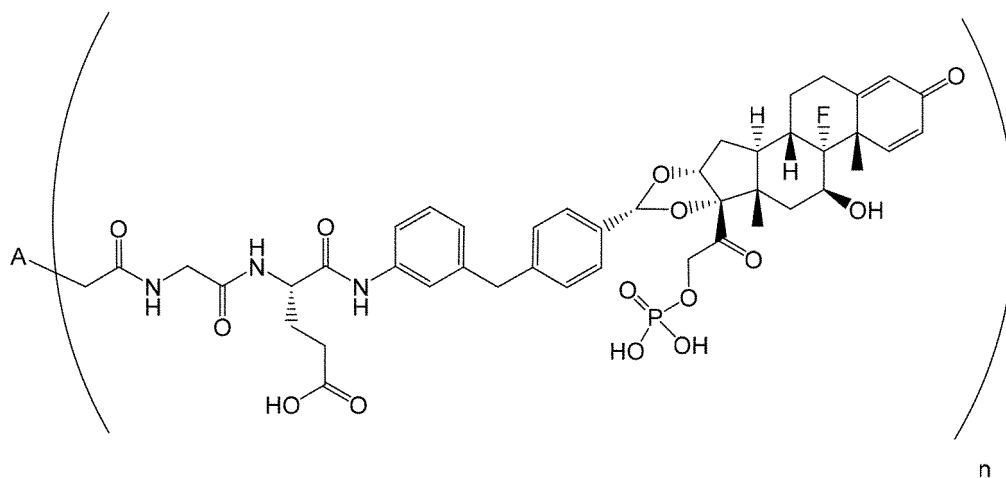
10

実施例 34-コンジュゲート型



20

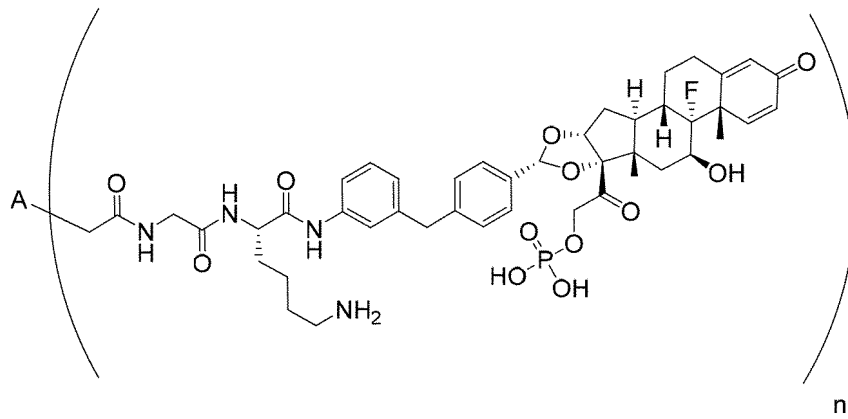
実施例 35-コンジュゲート型



40

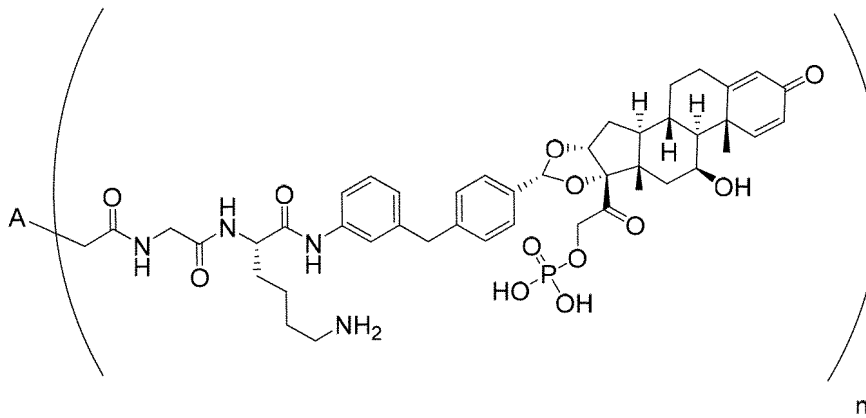
実施例 36-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC



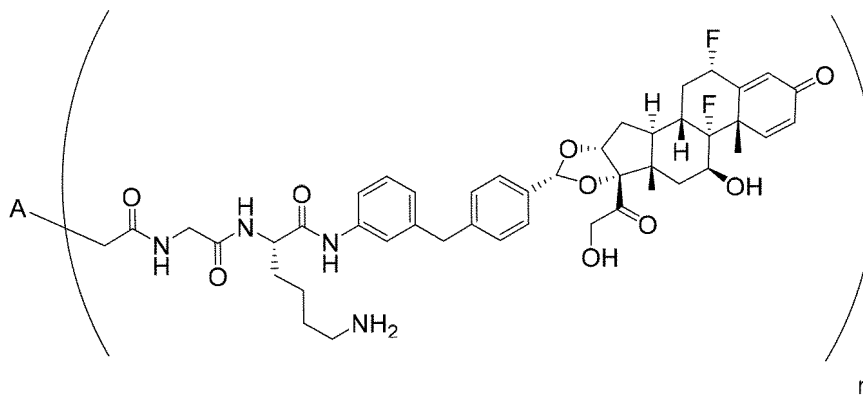
10

実施例 37-コンジュゲート型



20

実施例 38-コンジュゲート型

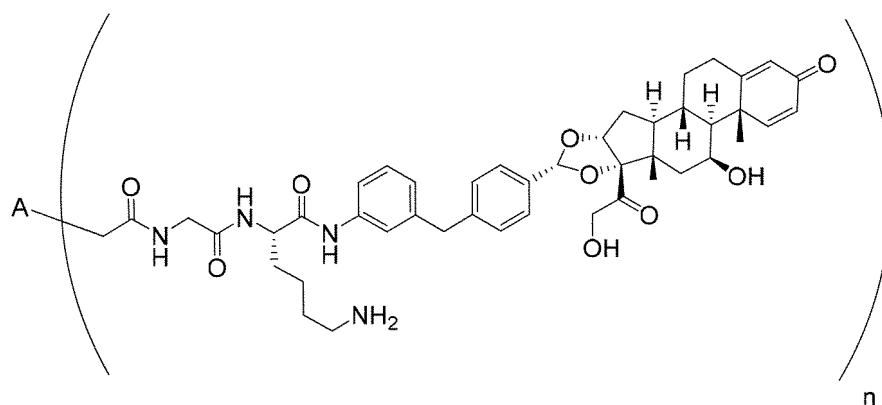


30

40

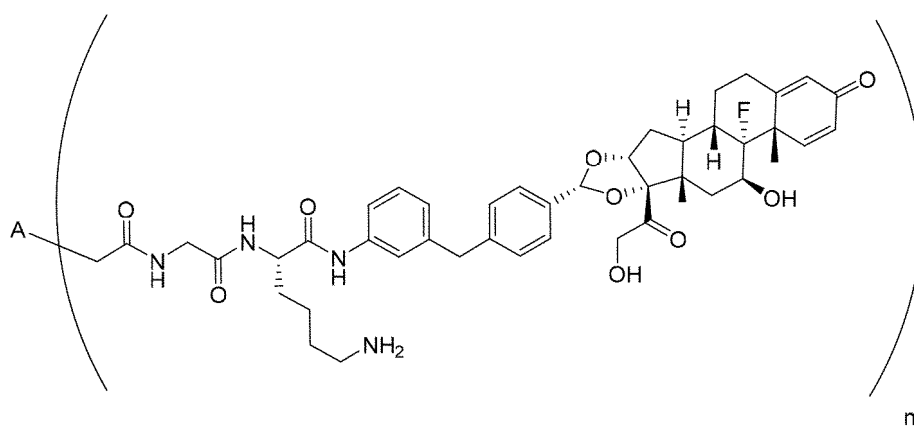
実施例 39-コンジュゲート型

表 5. コンjugateした ADC



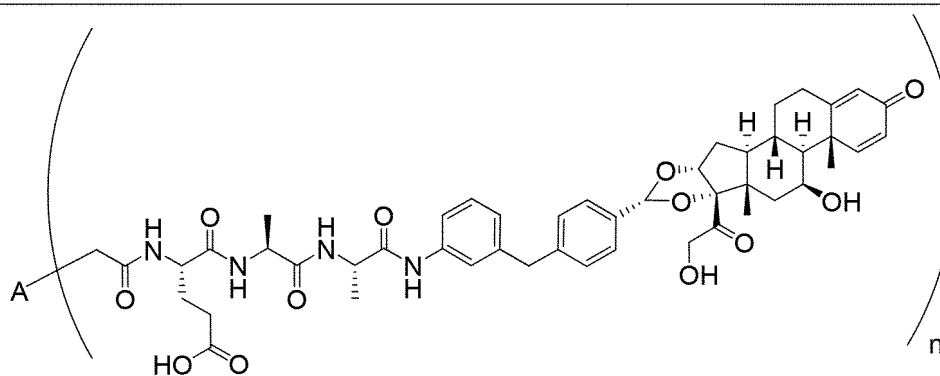
10

実施例 40-コンjugate型



20

実施例 41-コンjugate型



30

実施例 42-コンjugate型

40

表 5. コンjugateした ADC

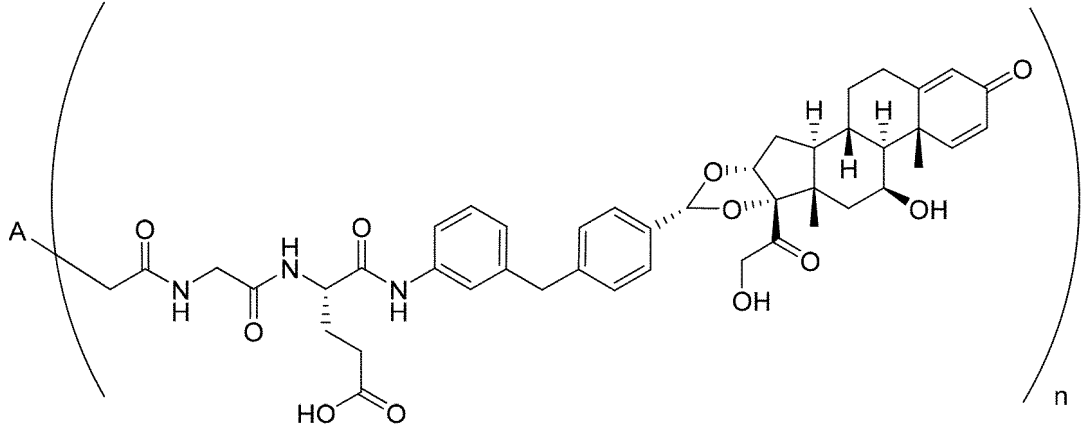
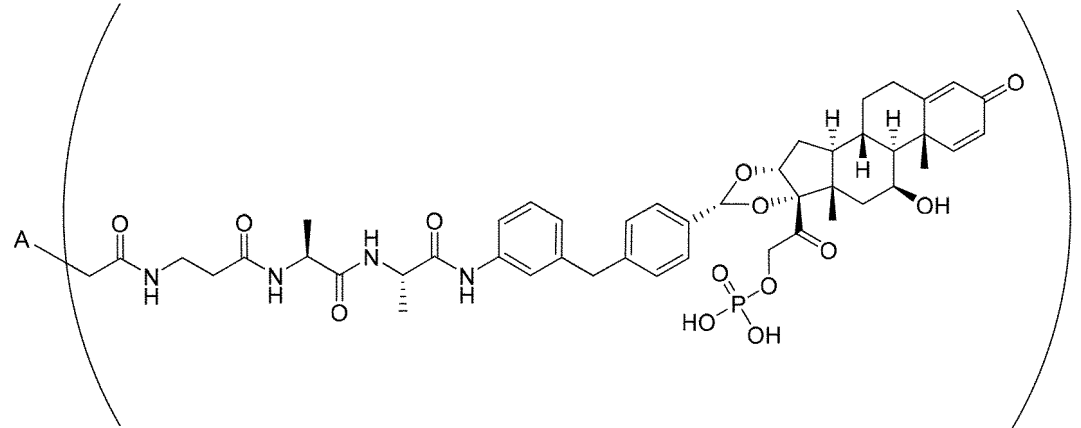
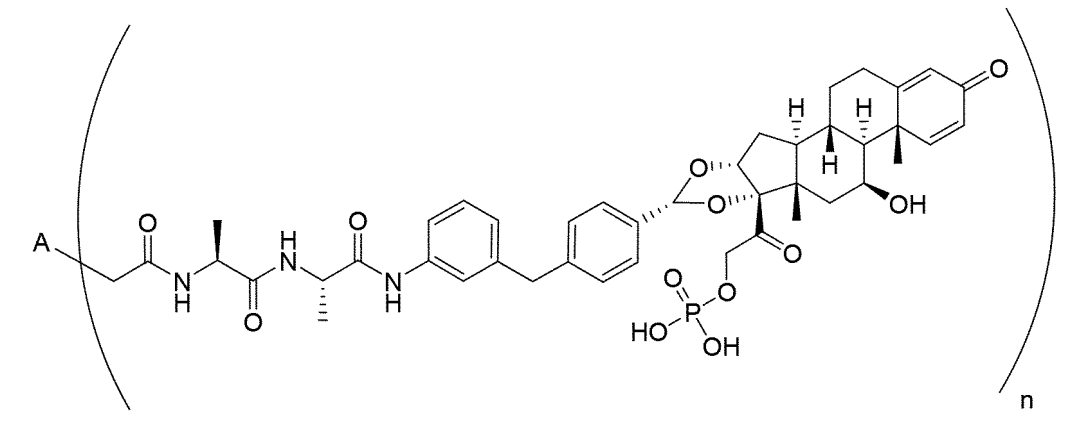
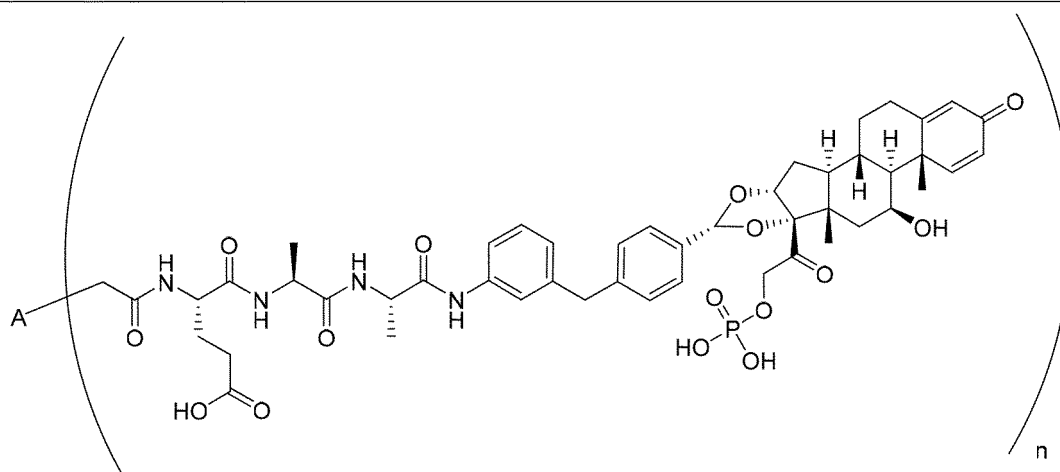
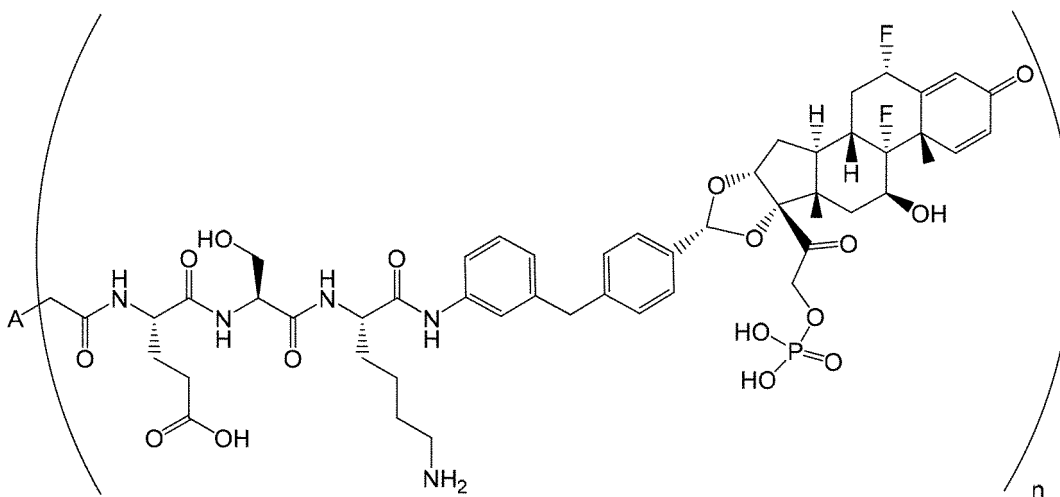
 <p>実施例 43-コンjugate型</p>	10
 <p>実施例 44-コンjugate型</p>	20
 <p>実施例 45-コンjugate型</p>	30 40

表5. コンジュゲートしたADC

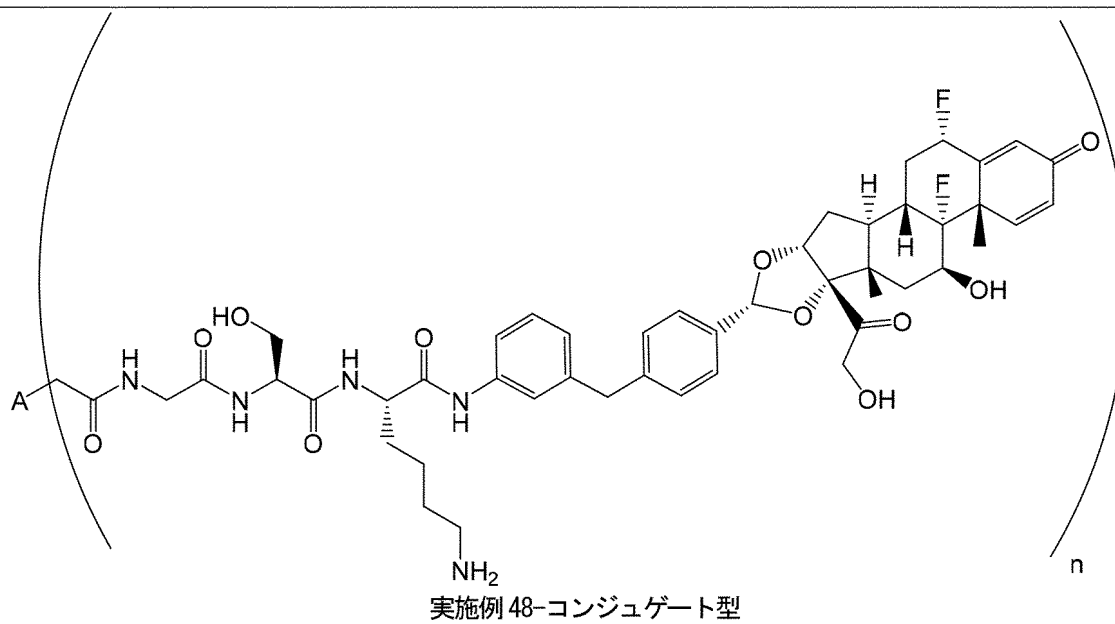


実施例 46-コンジュゲート型



実施例 47-コンジュゲート型

表5. コンジュゲートしたADC



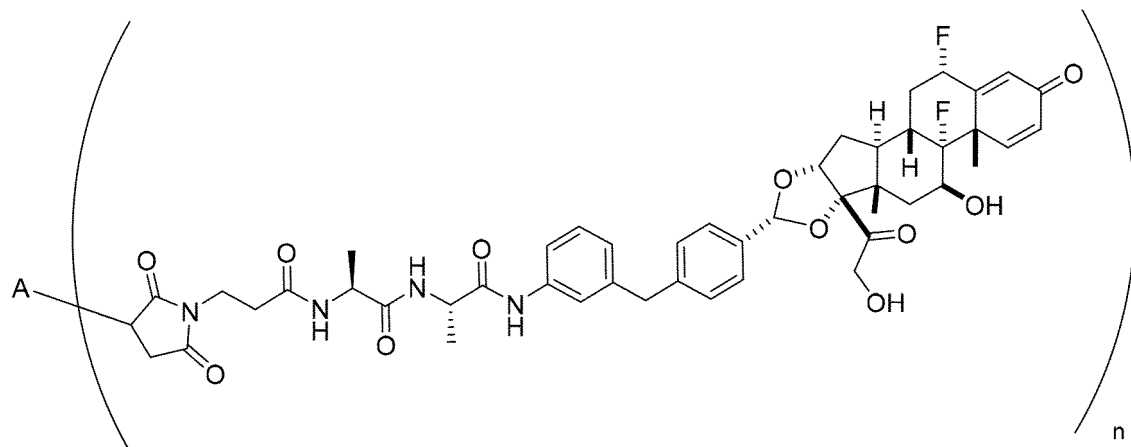
10

20

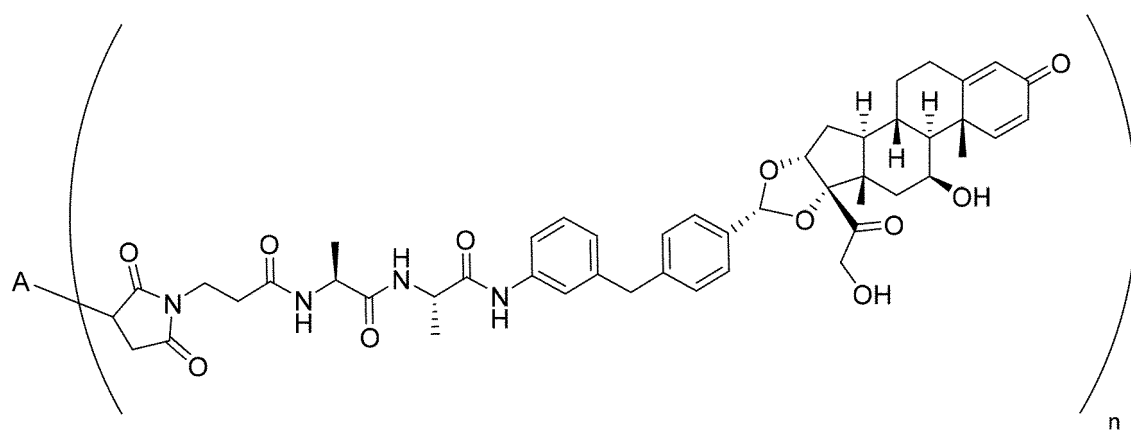
【 0 1 2 8 】

【表 4】

表 6A. コンジュゲートした ADC

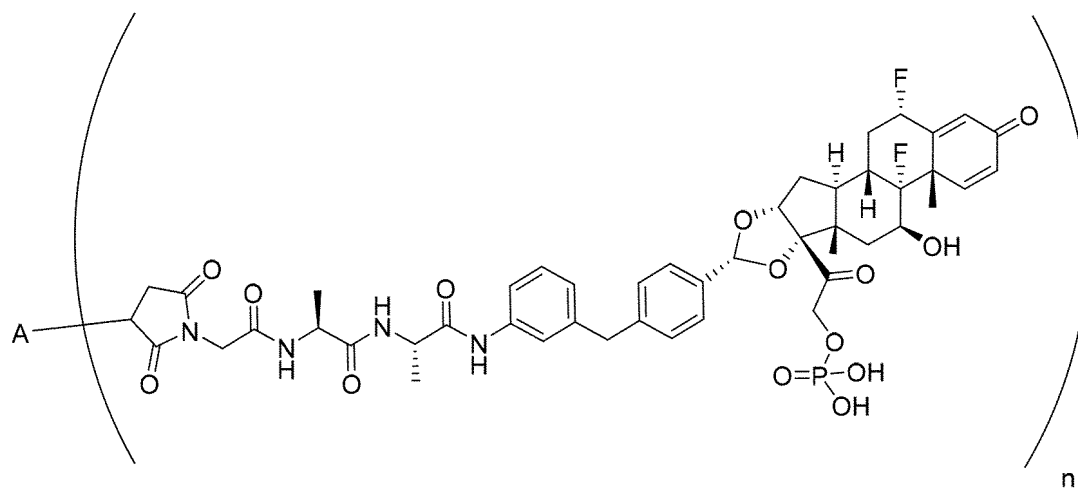


実施例 6-コンジュゲート型

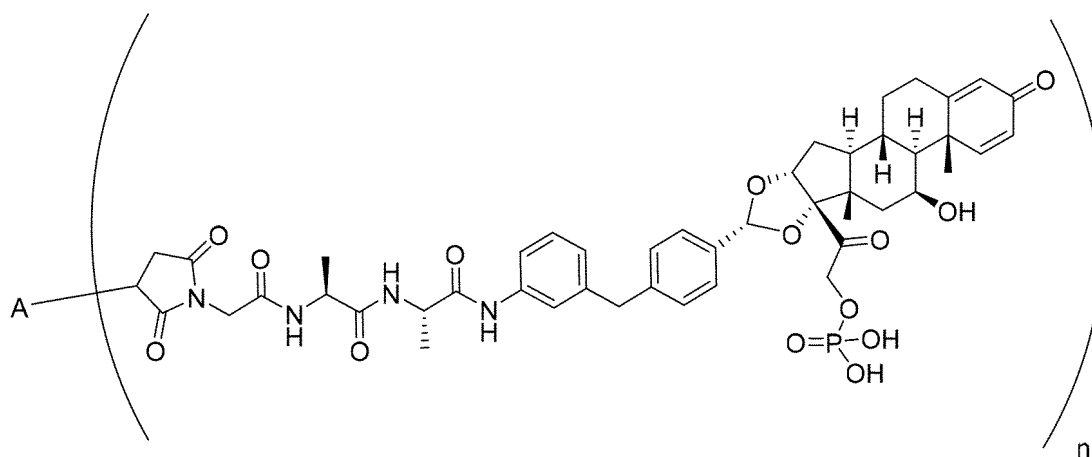


実施例 7-コンジュゲート型

表 6A. コンジュゲートした ADC

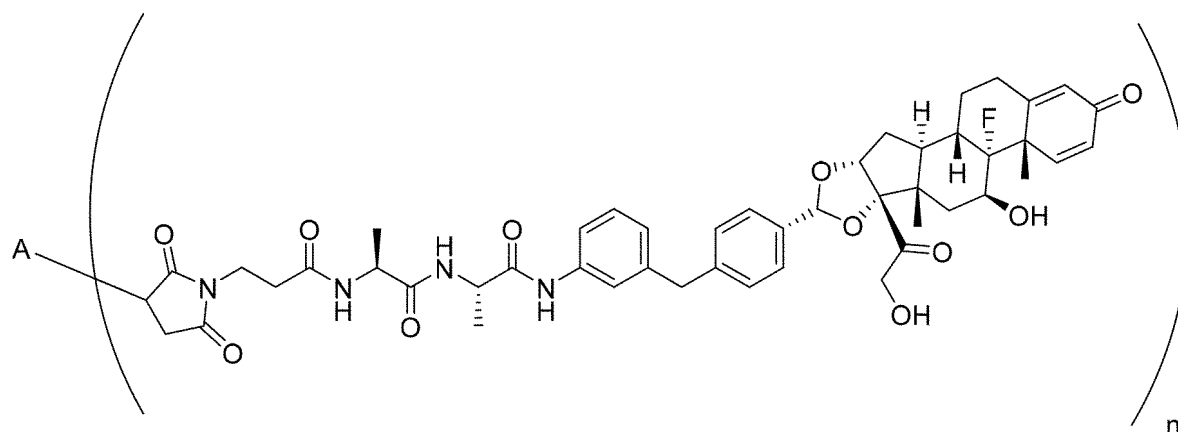


実施例 12-コンジュゲート型



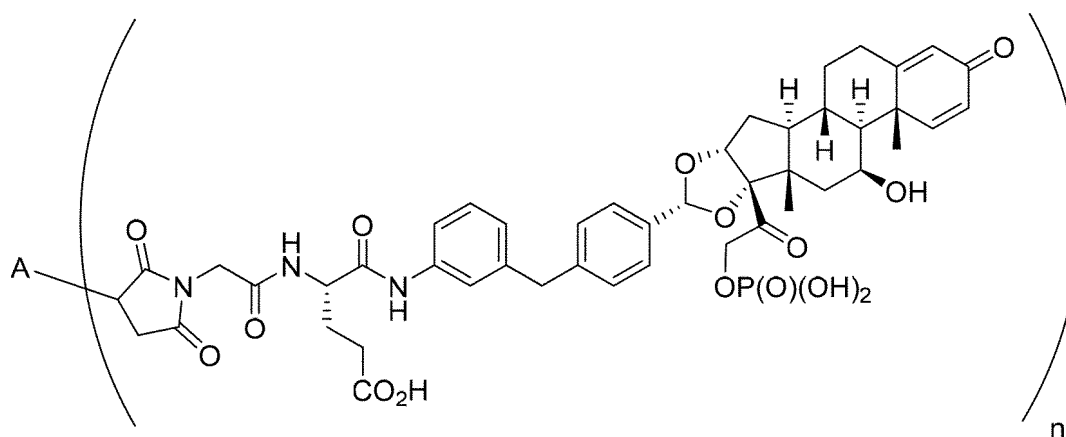
実施例 13-コンジュゲート型

表 6A. コンジュゲートした ADC



10

実施例 8-コンジュゲート型

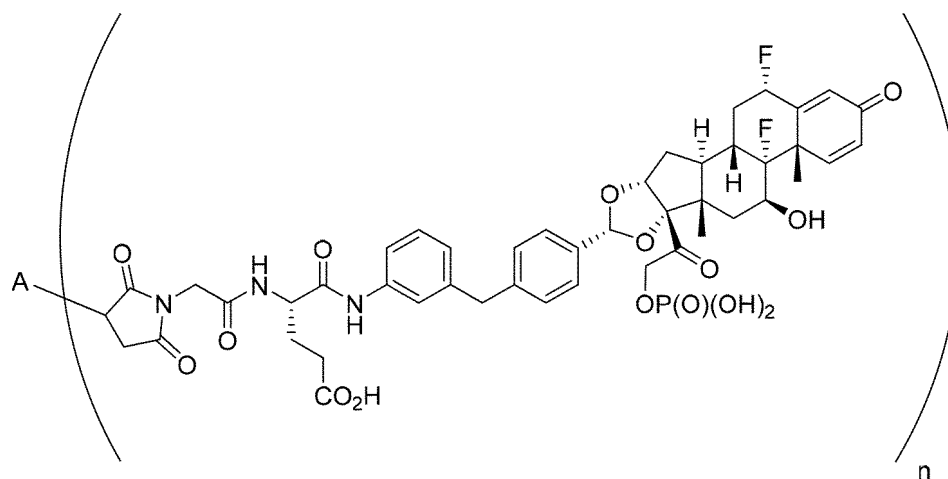


20

30

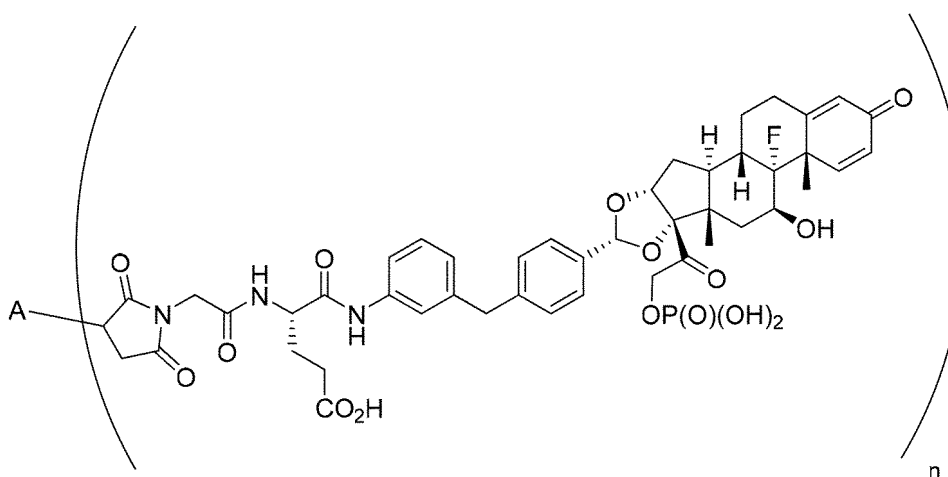
実施例 9-コンジュゲート型

表 6A. コンジュゲートした ADC



10

実施例 10-コンジュゲート型



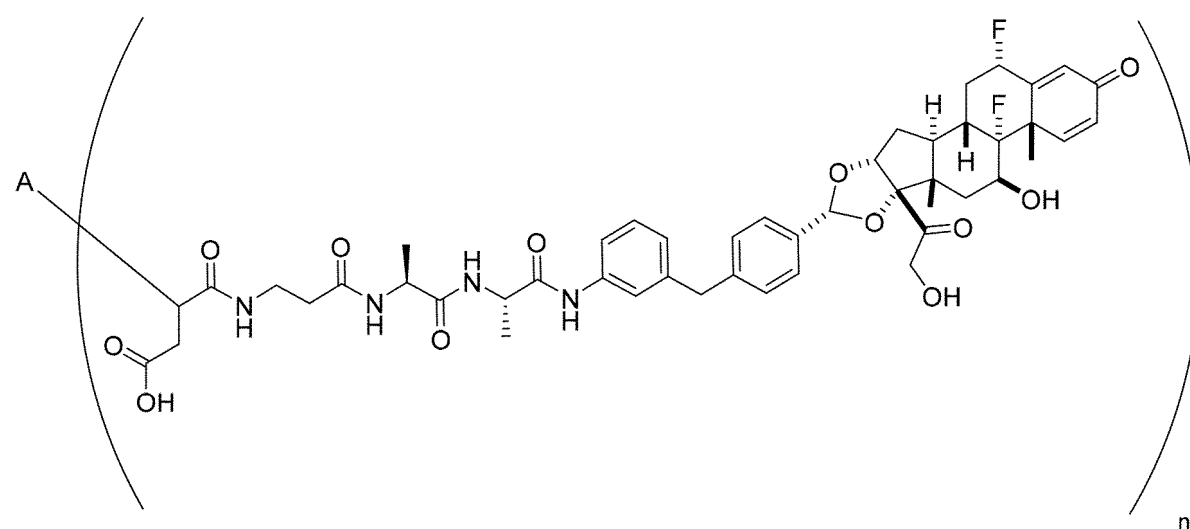
20

30

実施例 11-コンジュゲート型

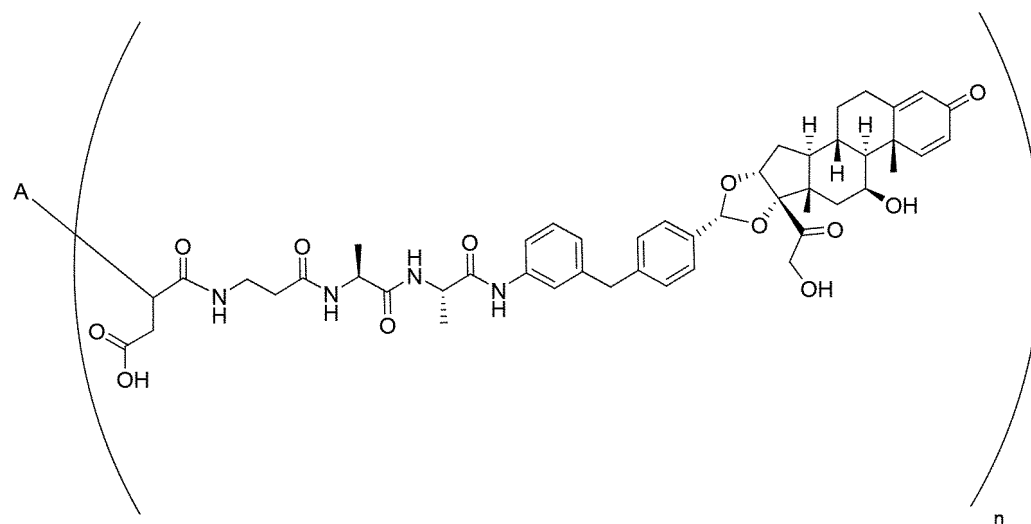
【表 5】

表 6B. コンjugate 及び加水分解した ADC



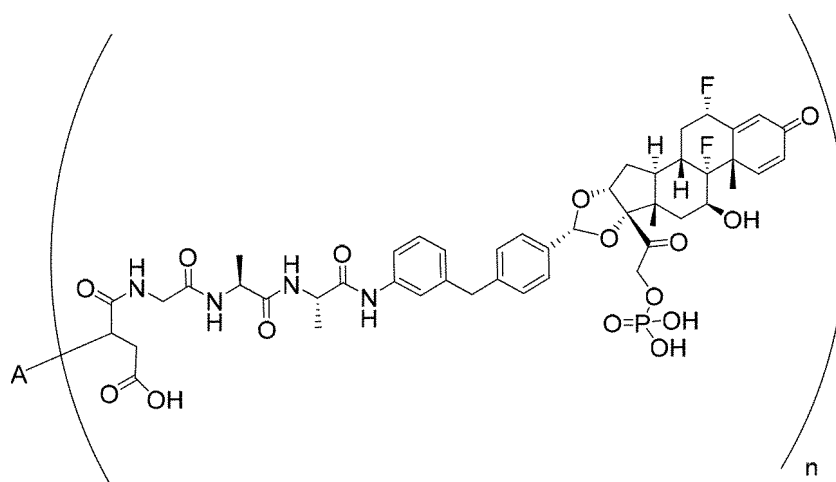
実施例 6-加水分解型

20



実施例 7-加水分解型

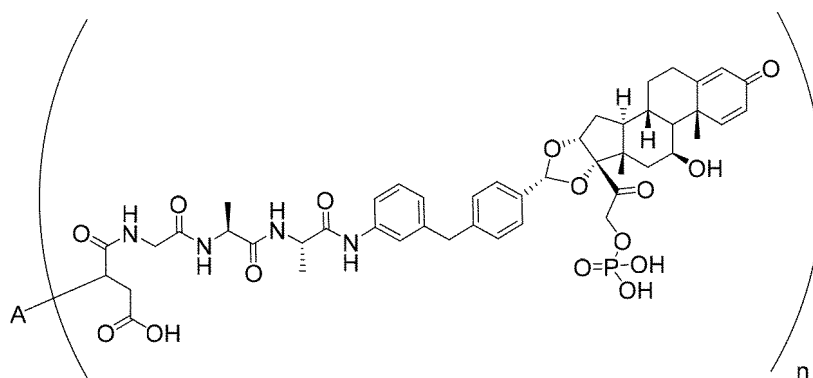
表 6B. コンジュゲート及び加水分解した ADC



10

実施例 12-加水分解型

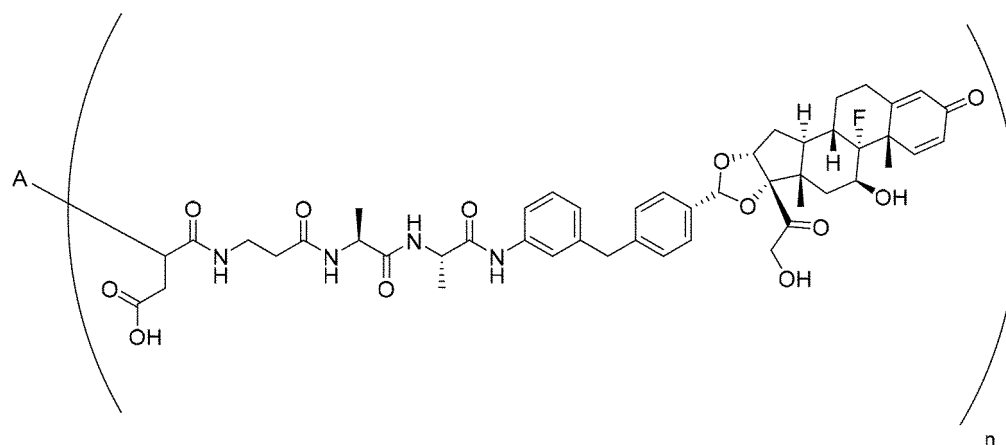
20



30

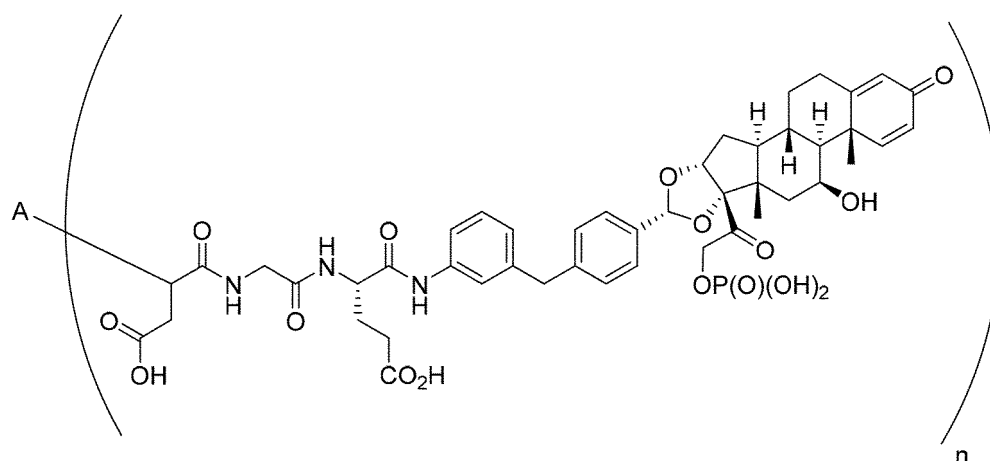
実施例 13-加水分解型

表 6B. コンジュゲート及び加水分解した ADC



10

実施例 8-加水分解型

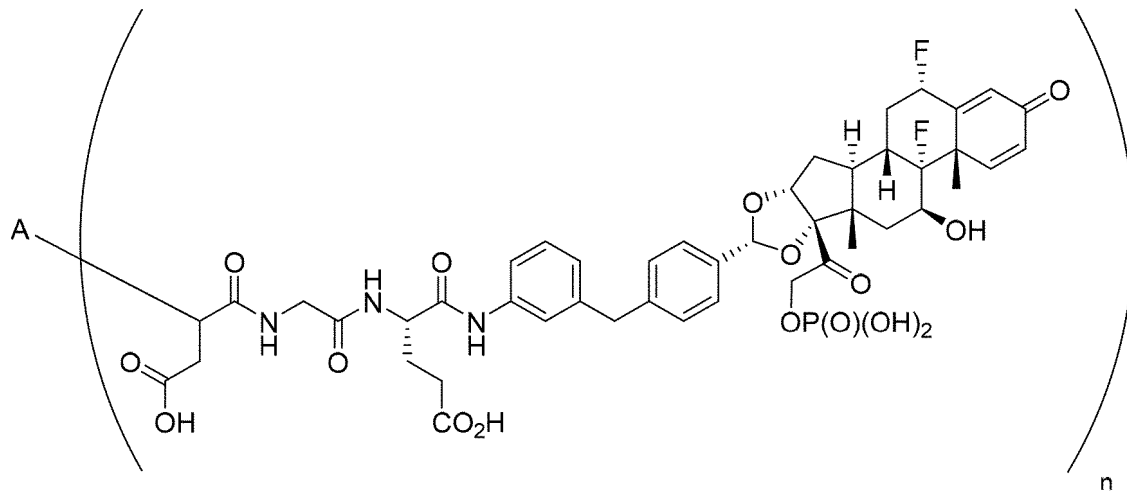


20

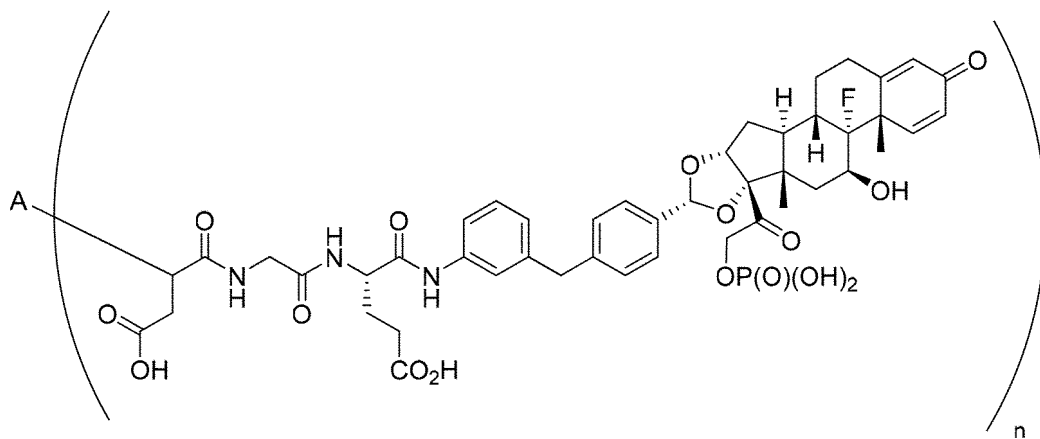
30

実施例 9-加水分解型

表 6B. コンジュゲート及び加水分解した ADC



実施例 10-加水分解型



実施例 11-加水分解型

【 0 1 3 0 】

表 5 のある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは実施例 4 - コンジュゲート型又は実施例 28 - コンジュゲート型である。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 として示された相補性決定領域 (CDR) を含む。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 5 として示された重鎖可変領域及び配列番号 6 として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 3 として示された重鎖及び配列番号 4 として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、n は 2 である。ある特定の実施形態において、n は 4 である。表 5 のある特定の

実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、n が 2 又は 4 である、実施例 4 - コンジュゲート型、実施例 28 - コンジュゲート型、又は実施例 47 - コンジュゲート型である。表 5 のある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、n が 2 である、実施例 47 - コンジュゲート型である。表 5 のある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、n が 4 である、実施例 47 - コンジュゲート型である。表 5 のある特定の

実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、n が 2 である、実施例 28 - コンジュゲート型である。表 5 のある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、n が 4

である、実施例 28 - コンジュゲート型である。

【0131】

表 6 A 及び 6 B のある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、実施例 6 - コンジュゲート型、実施例 6 - 加水分解型、実施例 7 - コンジュゲート型、実施例 7 - 加水分解型、実施例 12 - コンジュゲート型、実施例 12 - 加水分解型、実施例 13 - コンジュゲート型、又は実施例 13 - 加水分解型である。ある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは、実施例 6 - 加水分解型、実施例 7 - 加水分解型、実施例 12 - 加水分解型、又は実施例 13 - 加水分解型である。ある特定の実施形態において、化合物は実施例 6 - 加水分解型、実施例 7 - 加水分解型、又は実施例 12 - 加水分解型である。ある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートは実施例 12 - 加水分解型又は実施例 13 - 加水分解型である。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 として示された相補性決定領域 (CDR) を含む。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 5 として示された重鎖可変領域及び配列番号 6 として示された軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗 CD40 抗体は、配列番号 3 として示された重鎖及び配列番号 4 として示された軽鎖を含む。ある特定の実施形態において、n は 2 である。ある特定の実施形態において、n は 4 である。

10

【0132】

III. 使用の方法及び医薬組成物

インビトロ又はインビボで 사용할 ことができる式 (I) 又は (II) の抗体薬物コンジュゲートが本明細書に提供されている。したがって、組成物、例えば、ある特定のインビボでの使用のための医薬組成物であって、生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990 年) Mack Publishing Co., Easton, PA) 中に、所望の程度の純度を有する式 (I) 又は (II) の抗体薬物コンジュゲートを含む、医薬組成物もまた提供される。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、利用する用量及び濃度においてレシピエントに非毒性である。

20

【0133】

インビボでの投与のために使用される組成物 (例えば、医薬組成物) は、滅菌であることができ、滅菌は、例えば、無菌化濾過膜を介した濾過により達成することができる。インビボ投与に使用される組成物 (例えば、医薬組成物) は保存剤を含むことができる。

30

【0134】

抗体薬物コンジュゲートは、当技術分野の知識に従い、剤形に製剤化し、投与することができる (例えば、静脈内投与又は点滴を介して)。

【0135】

抗体薬物コンジュゲート及び / 又は本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲートを含む医薬組成物は、CD40 を発現する細胞を溶解すること (インビトロ又はインビボで) 及び / 又は CD40 の増加により特徴付けられる疾患又は障害の治療に有用となり得る。一部の実施形態において、抗体薬物コンジュゲート及び / 又は組成物は、サイトカイン放出の阻害において (インビトロ又はインビボで) 及び / 又は自己免疫性又は炎症性疾患の治療に対して有用である。

40

【0136】

ある特定の実施形態において、これを必要とする対象において、炎症性腸疾患 (IBD)、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎 (HS) からなる群から選択される状態を治療する方法であって、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む方法が提供される。ある特定の実施形態において、状態は炎症性腸疾患 (IBD) である。ある特定の実施形態において、IBD は潰瘍性大腸炎 (UC) 又はクローン病である。ある特定の実施形態において、状態は全身性エリテマトーデス (SLE) である。ある特定の実施形態において、状態は多発性硬化症である。ある特定の実施形

50

態において、状態は関節リウマチである。ある特定の実施形態において、状態はシェーグレン症候群である。ある特定の実施形態において、状態は化膿性汗腺炎（HS）である。

【0137】

別の実施形態において、炎症性腸疾患（IBD）、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎（HS）からなる群から選択される状態の治療における使用のための、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物が提供される。

【0138】

別の実施形態において、炎症性腸疾患（IBD）、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎（HS）からなる群から選択される状態を治療するための医薬の調製のための、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物が提供される。

10

【0139】

一部の実施形態は、CD40発現細胞にグルココルチコイド受容体アゴニストを送達する方法を含む。このような方法は、CD40発現細胞を、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲートに接触させるステップを含むことができる。一部の実施形態は、グルココルチコイド受容体アゴニストをCD40発現細胞にインビトロで送達する方法を含む。

【0140】

抗体薬物コンジュゲートの抗炎症性活性を決定する方法もまた提供される。このような方法は、CD40発現細胞を、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲートに接触させるステップを含むことができる。一部の実施形態は、CD40発現細胞を、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲートに接触させ、細胞からの炎症誘発性サイトカインの放出の減少を、対照細胞と比較して決定することを含む。一部の実施形態は、抗体薬物コンジュゲートの抗炎症性活性を決定するインビトロの方法を含む。

20

【0141】

一部の実施形態は、直接的に又は間接的に、細胞（例えば、CD40発現細胞）を、抗体薬物コンジュゲートに接触させること、及び抗体薬物コンジュゲートが、例えば、細胞形態又は生存率の変化、マーカーの発現、分化又は脱分化、細胞呼吸、ミトコンドリア活性、膜統合性、熟成、増殖、生存率、アポトーシス又は細胞死により反映される、細胞の活性又は機能をモジュレートするかどうか決定することを含むスクリーニング法（例えばインビトロの方法）を含む。直接的相互作用の1つの例は物理的相互作用であり、その一方で間接的相互作用は、例えば、中間分子に対して組成物が作用し、ひいては、参照された実体（例えば、細胞又は細胞培養物）に作用することを含む。

30

【0142】

よって、ある特定の実施形態において、グルココルチコイド受容体アゴニストをCD40発現細胞に送達する方法であって、細胞を、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物に接触させるステップを含む方法が提供される。

【0143】

さらにある特定の実施形態において、抗体薬物コンジュゲートの抗炎症性活性を決定する方法であって、CD40発現細胞を、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲートに接触させること、及び対照細胞と比較して、細胞からの炎症誘発性サイトカインの放出の減少を決定することを含む方法が提供される。

40

【0144】

IV. 製造物品

本開示はまた、1個以上の容器を含む医薬品パック及びキットであって、容器が、1つ以上の用量の、本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲート又は組成物を含むことができる医薬品パック及びキットを含む。ある特定の実施形態において、パック又はキットは、単位用量を含有し、この単位用量とは、1種以上の追加の薬剤を有する、又は1個以上の追加の薬剤を有さない、組成物又は抗体薬物コンジュゲートの既定量を意味する。

50

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態において、キットは、非水性溶液又は水溶液であってよい1種以上の液体溶液で提供される。一部の実施形態において、溶液は無菌溶液である。キット中の組成物はまた、適当な液体の添加により再構成することができる乾燥粉末（複数可）又は凍結乾燥形態として提供され得る。再構成に使用される液体は、別個の容器に含有されていてもよい。このような液体は、滅菌の、薬学的に許容される緩衝液（複数可）又は他の希釈剤（複数可）、例えば、注射のための静菌剤、リン酸緩衝食塩水、リンガー液又はブドウ糖溶液を含むことができる。

【 0 1 4 6 】

キットは、1個又は複数の容器、及びこの容器（複数可）内、容器上、又は容器に付随したラベル又はパッケージ添付文書を含むことができ、これらのラベル又はパッケージ添付文書は封入された組成物が、選択の病態を治療するために使用されることを示している。適切な容器として、例えば、ビン、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器は、様々な物質、例えば、ガラス又はプラスチックから形成することができる。容器（複数可）は、滅菌のアクセスポートを含むことができ、例えば、容器は、皮下注射用注射針で刺すことができるストッパーを有する静脈用溶液バッグ又はバイアルであってよい。

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態において、キットは、抗体薬物コンジュゲート及びいずれかの任意選択的構成成分を、これを必要とする対象に投与するために使う手段、例えば、1種以上の針若しくはシリンジ（予備充填した又は空のもの）、目薬の容器、ピペット、又は他のこのような装置を含有することができ、組成物は、これらから対象に注入若しくは導入する、又は身体の罹患した領域に適用することができる。本開示のキットはまた、バイアル、又はそのようなもの、及び他の構成成分を、商業用販売のために、例えば、この中に所望のバイアル及び他の装置を配置し、保持するブロー成形したプラスチック容器などの中に密閉して含有するための手段を通常含む。

【 0 1 4 8 】

よって、ある特定の実施形態において、

(a) 本明細書に記載されている抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物を含む容器；及び

(b) 1個以上の容器上の、又はこれに付随するラベル又はパッケージ添付文書であって、抗体薬物コンジュゲート又は医薬組成物が炎症性腸疾患（IBD）、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症、関節リウマチ、シェーグレン症候群、及び化膿性汗腺炎（HS）からなる群から選択される状態を治療するために使用されることを示すラベル又はパッケージ添付文書を含むキットが提供される。

【 実施例 】

【 0 1 4 9 】

本明細書に記載されている実施例及び実施形態は、例証的目的のためのみのものであり、その観点から様々な修正又は変化が、当業者に示唆され、本開示の趣旨及び認識の範囲内に含まれるものとすることを理解されたい。

【 0 1 5 0 】

分析法

1. 小分子分析手順

他に述べられていない限り、すべての ^1H 及び ^{13}C NMR（核磁気共鳴）データはVarian Mercury Plus 400 MHz又はBruker AVII 300 MHz装置で収集した。化学シフトは百万分率（ppm）で提示されている。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及びLCMS分析用データは、実験部分で詳述されている、又は表7に列挙された条件を基準とする。

【 0 1 5 1 】

【表 6】

表 7. LCMS 及び HPLC 法のリスト	
方法	条件
a	勾配は 1~90%B で 3.4 分間、90~100%B で 0.45 分間、100~1%B で 0.01 分間であり、次いで 1%B で 0.65 分間保持 (0.8mL/分の流量)。移動相 A は、H ₂ O 中 0.0375%トリフルオロ酢酸、移動相 B はアセトニトリル中 0.018%トリフルオロ酢酸であった。クロマトグラフィーに使用されたカラムは 2.0×50mm Phenomenex Luna-C18 カラム (5μm 粒子) であった。検出方法はダイオードアレイ (DAD) 及び蒸発光散乱検出器 (ELSD) 並びに陽性エレクトロスプレーイオン化である。
b	5~100%アセトニトリル(A) 及び水中 0.1%トリフルオロ酢酸(B) の勾配を 1.5mL/分の流量で使用した (0~0.05 分、5%A、0.05~1.2 分、5~100%A、1.2~1.4 分、100%A、1.4~1.5 分、100~5%A、0.25 分の作動後の遅延)
c	勾配は 5~90%B で 3.4 分、90~100%B で 0.45 分、100~5%B で 0.01 分であり、次いで 5%B で 0.65 分保持した (0.8mL/分流量)。移動相 A は 10mM NH ₄ HCO ₃ であり、移動相 B は HPLC 等級アセトニトリルであった。クロマトグラフィーに使用したカラムは 2.1×50mm Xbridge Shield RPC18 カラム (5μm 粒子) である。検出方法はダイオードアレイ (DAD) 及び蒸発光散乱 (ELSD) 検出並びに陽性エレクトロスプレーイオン化 (MS) である。
AA1	装置:Shimadzu LC-8A 分取 HPLC。カラム:Phenomenex Luna C18 200×40mm×10μm。移動相 A:H ₂ O (0.09%トリフルオロ酢酸) 及び B:アセトニトリル。勾配:B 40%~60%、20 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm。
AA2	装置:Gilson 281 半分取 HPLC システム。移動相 A:トリフルオロ酢酸/H ₂ O=0.075%v/v;B:アセトニトリル。カラム:Nano-micro Kromasil C18 100×30mm 5μm。流量:25mL/分。モニター波長:220&254nm。
AA3	装置:Gilson 281 半分取 HPLC システム。移動相 A:トリフルオロ酢酸/H ₂ O=0.075%v/v;B:アセトニトリル。カラム:Phenomenex Synergi C18 100×30mm×4μm 流量:25mL/分。モニター波長:220&254nm
AA4	勾配は 1~90%B で 3.4 分、90~100%B で 0.45 分、100~1%B で 0.01 分であり、次いで 1%B で 0.65 分保持した (0.8mL/分の流量)。移動相 A:水中 0.0375%トリフルオロ酢酸、B:アセトニトリル中 0.018%トリフルオロ酢酸。クロマトグラフィーに使用したカラムは 2.0×50mm PhenomenexLuna-C18 カラム (5μm 粒子) であった。検出方法は DAD 及び ELSD 検出並びに陽性エレクトロスプレーイオン化 (MS) である。
AA5	装置:Gilson 281 半分取 HPLC システム。移動相 A:トリフルオロ酢酸/H ₂ O=0.075%v/v;B:アセトニトリル。カラム:Luna C18 100×30 5μm。流量:25mL/分。モニター波長:220&254nm。10 分間にわたり勾配 B 25~100%。

10

20

30

40

表 7. LCMS 及び HPLC 法のリスト

方法	条件
AA6	装置:Shimadzu LC-8A 分取 HPLC。カラム:Phenomenex Luna C18 200×40mm×10 μ m。移動相 A:H ₂ O (0.09%トリフルオロ酢酸);B:アセトニトリル。勾配:B15%~45%で 20 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm。
AA7	装置:Shimadzu LC-8A 分取 HPLC。カラム:Phenomenex Luna C18 200×40mm×10 μ m。移動相 A:H ₂ O 及び B:アセトニトリル。勾配:B50%~100%を 30 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm。
AA8	カラム:Phenomenex Luna C18200×40mm×10 μ m。移動相 A:H ₂ O (0.09%トリフルオロ酢酸) 及び B:アセトニトリル。勾配:B 35%~55%を 20 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm。
AA9	装置:Gilson 281 半分取 HPLC システム。移動相 A:トリフルオロ酢酸/H ₂ O=0.075v/v;B:アセトニトリル。カラム:Luna C18 100×30 5 μ m。流量:15mL/分。モニター波長:220&254nm。10 分間にわたり勾配 B 15~100%。
AA10	装置:Shimadzu LC-8A 分取 HPLC。カラム:Phenomenex Luna C18 200×40mm×10 μ m。移動相 A H ₂ O (0.09%トリフルオロ酢酸) 及び B:アセトニトリル。勾配:B20%~40%で 20 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm。
AA11	装置:Gilson 281 半分取 HPLC システム。移動相 A:トリフルオロ酢酸/H ₂ O=0.075v/v;B:アセトニトリル。カラム:Luna C18 100×30 5 μ m。流量:15mL/分。モニター波長:220&254nm。10 分間にわたり勾配 B50~100%。
AA12	装置:Gilson 281 半分取 HPLC システム。移動相 A:トリフルオロ酢酸/H ₂ O=0.075v/v;B:アセトニトリル。カラム:Luna C18 100×30 5 μ m。流量:25mL/分。モニター波長:220&254nm。10 分間にわたり勾配 B10~100%。
AA13	勾配は 5~95%B で 0.7 分、95~95%B で 0.45 分、95~5%B で 0.01 分であり、次いで 0%B で 0.44 分間保持した (1.5mL/分の流量)。移動相 A:水中 0.0375%トリフルオロ酢酸、移動相 B:アセトニトリル中 0.018%トリフルオロ酢酸。クロマトグラフィーに使用したカラムは Chromolith Flash RP-18e 25~2mm カラムである。検出方法は DAD 及び ELSD 検出並びに陽性エレクトロスプレーイオン化 (MS) である。
AA14	装置:Shimadzu LC-8A 分取 HPLC。カラム:Phenomenex Luna C18 200×40mm×10 μ m。移動相 A:H ₂ O (0.05%トリフルオロ酢酸) 及び B:アセトニトリル。勾配:B30%~100%で 30 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm。
AA15	勾配は 10~80%B で 4 分であり、80%B で 0.9 分保持し、80~10%B で 0.01 分であり、次いで 10%B で 1 分保持した (0.8mL/分の流量)。移動相 A は水中 0.0375%トリフルオロ酢酸であり、移動相 B はアセトニトリル中 0.018%トリフルオロ酢酸であった。クロマトグラフィーに使用したカラムは 2.0×50mm phenomenex Luna-C18 カラム (5 μ m 粒子) であった。検出方法は DAD である。

10

20

30

40

表 7. LCMS 及び HPLC 法のリスト	
方法	条件
AA16	勾配は 15~100%B で 8.00 分であり、100%B で 2 分保持し、100~15%B で 0.01 分であり、次いで 15% で 5.00 分保持し、流量は 0.80ml/分であった。移動相 A は 10mM 炭酸水素アンモニウムであり、移動相 B は HPLC 等級アセトニトリルであった。クロマトグラフィーに使用したカラムは 2.1×50mm Xbridge Shield RPC18 カラム(5μm 粒子)であった。検出方法は DAD 及び ELSD 検出並びに陽性エレクトロスプレーイオン化である。
AA17	装置:Shimadzu LC-8A 分取 HPLC。カラム:Phenomenex Luna C18 200×40mm×10μm。移動相:H ₂ O に対して A(0.09%トリフルオロ酢酸) 及びアセトニトリルに対して B。勾配:B30%~40%で 20 分。流量:60mL/分。波長:220&254nm
AA18	勾配は、5~95%B で 1.0 分、95~100%B で 0.80 分、100~5%B で 0.01 分であり、次いで 5%B で 0.39 分保持した(1.0mL/分の流量)。移動相 A は水中 0.0375%TFA であり、移動相 B は MeCN 中 0.018%TFA であった。クロマトグラフィーに使用したカラムは、ZORBAX Eclipse XDB-C18 2.1×30mm、3.5μm であった。検出方法はダイオードアレイ (DAD) 及び陽性エレクトロスプレーイオン化 (MS) である。
AA19	勾配は 10~90%B で 1.15 分であり、90%B で 0.50 分保持し、90~10%B で 0.01 分であり、次いで 10%B で 0.34 分保持した。移動相 A は水中 10mM NH ₄ HCO ₃ であり、移動相 B は MeCN であった。クロマトグラフィーに使用したカラムは Xbridge Shield RP18 2.1×50mm、5μm であった。検出方法はダイオードアレイ (DAD) 及び陽性エレクトロスプレーイオン化 (MS) である。システム流量は 0.8mL/分(0.00~1.51 分)、1.2mL/分(1.52~2.00 分)であった。
AA20	装置:Gilson281 半分取 HPLC システム。移動相:A:NH ₄ OH/H ₂ O=0.040%v/v;B:MeCN。カラム:YMC-Actus Triart C18 100×30mm×5μm。流量:25mL/分。モニター波長:220&254nm。12 分間にわたり勾配 B10~30%。

10

20

30

【 0 1 5 2 】

2. A D C 分析手順

A D C は、コンジュゲーションの度合及び A D C の純度を決定するために、アニオン性交換クロマトグラフィー (A E C) 又は疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) でプロファイリングした。

【 0 1 5 3 】

アニオン性交換クロマトグラフィー (A E C)。

【 0 1 5 4 】

およそ 20 μg の A D C を 4 × 250 mm Propac (商標) WAX - 10 カラム (Tosoh Bioscience、cat. 054999) を備えた Ultimate 3000 Dual LC システム (Thermo Scientific) に充填した。カラムを 100% 緩衝液 A で平衡化し、100% 緩衝液 A から 100% 緩衝液 B への線型勾配を、1.0 mL / 分で 18 分間にわたり使用して溶出した。緩衝液 A は 20 mM MES、pH 6.7 であり、緩衝液 B は 20 mM MES、500 塩化ナトリウム、pH 6.7 である。

40

【 0 1 5 5 】

疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)。

【 0 1 5 6 】

およそ 20 μg の A D C を、4.6 × 35 mm プチル - NPR カラム (Tosoh B

50

ioscience、cat. 14947)を備えたUltimate 3000 Dual LCシステム(Thermo Scientific)に充填した。カラムを100%緩衝液A中で平衡化し、100%緩衝液Aから100%緩衝液Bへの線型勾配を、0.8 mL/分で12分間にわたり使用して溶出した。緩衝液Aは25 mMリン酸ナトリウム、1.5 M硫酸アンモニウム、pH 7.0であり、緩衝液Bは25 mMリン酸ナトリウム、25%イソプロパノール、pH 7.0である。

【0157】

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)。

【0158】

ADCのサイズ分布を、7.8×300 mm TSK-ゲル 3000 SW_{xL}カラム(Tosoh Bioscience、cat. 08541)を備えたUltimate 3000 Dual LCシステム(Thermo Scientific)を使用して、サイズ排除SECによりプロファイリングした。およそ20 µgのADCをカラムに充填し、100 mM硫酸ナトリウム、100 mMリン酸ナトリウムの均一濃度勾配を、pH 6.8、流量1.0 mL/分で使用して、17分間にわたり溶出した。

10

【0159】

凝集実験もまたSECを使用して行うことができ、凝集パーセンテージは、ゲル濾過標準物質(Bio-rad、151-1901)により決定された凝集ピークの領域を積分することにより測定することができる。

20

質量分析(MS)。

【0160】

温度制御された(5)CTCオートサンプラーを介して、還元した試料(10 µL)をAgilent 6550 QToF LC/MSシステムに注入した。試料溶出は、Waters C-4、3.5 µm、300、2.1×50 mm、すなわち、HPLCカラムで達成した。移動相は、A：水中0.1%ギ酸、及びB：アセトニトリル中0.1%ギ酸であり、流量は0.45 mL/分であり、カラム区画は40で維持した。HPLC勾配は以下の通りである：

【0161】

【表7】

30

表 8. LCMS に対する勾配		
時間(分)	%A	%B
0	95	5
0.6	95	5
1.1	10	90
2.2	10	90
2.4	95	5
3.5	95	5

【0162】

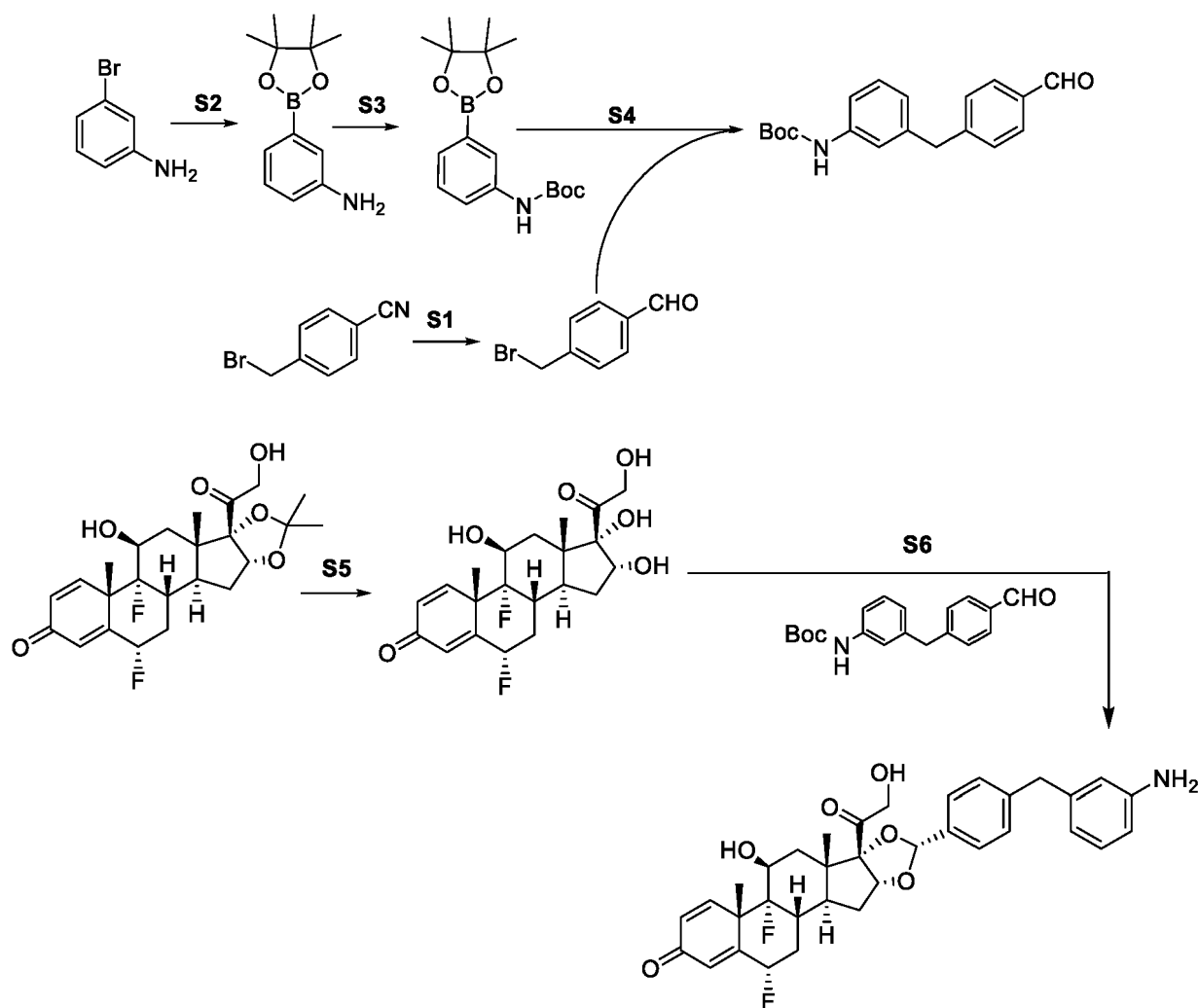
40

前駆体分子の合成

[前駆体実施例1] (2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-アミノベンジル)フェニル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-4H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-4-オンの合成

【0163】

【化 2 2】



10

20

30

40

50

【0164】

ステップ1：4 - (プロモメチル) ベンズアルデヒドの合成。水素化ジイソブチルアルミニウム (153 mL、153 mmol、トルエン中1M) を、4 - (プロモメチル) ベンゾニトリル (20 g、102 mmol) のトルエン (400 mL) 中0 溶液に1時間にわたり滴下添加した。2つの追加反応を上に記載されているように設定した。すべての3つの反応混合物を合わせた。混合物に、10%水性HCl (1.5 L) を加えた。混合物をジクロロメタン (3 × 500 mL) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー (石油エーテル/酢酸エチル = 10/1で溶出) で精製して、表題化合物を得た (50 g、収率82%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 10.02 (s, 1H), 7.91 - 7.82 (m, 2H), 7.56 (d, J=7.9 Hz, 2H), 4.55 - 4.45 (m, 2H).

【0165】

ステップ2：3 - (4, 4, 5, 5 - テトラメチル - 1, 3, 2 - ジオキサボロラン - 2 - イル) アニリンの合成。3 - プロモアニリン (40 g、233 mmol) の1, 4 - ジオキサン (480 mL) 中溶液に、4, 4, 4', 4', 5, 5, 5', 5' - テトラメチル - 2, 2' - ビ (1, 3, 2 - ジオキサボロラン) (94 g、372 mmol)、酢酸カリウム (45.6 g、465 mmol)、2 - ジシクロヘキシルホスフィノ - 2', 4', 6' - トリ - i - プロピル - 1, 1' - ビフェニル (8.07 g、13.95 mmol)、トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (0) (8.52 g、9.30 mmol) を加えた。次いで、生成した混合物を80 で、4時間窒素下で加熱した。追加反応を上に記載されているように設定した。2つの反応混合物を合わせ、濃縮し、残

渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー（石油エーテル：酢酸エチル＝１０：１で溶出）で精製して、表題化合物を得た（６０ｇ、収率５５．４％）。¹H NMR（４００MHz, CDCl₃） 7.23 - 7.13 (m, 3H), 6.80 (d, J=7.5 Hz, 1H), 3.82 - 3.38 (m, 2H), 1.34 (s, 12H)。

【０１６６】

ステップ３：tert-ブチル（３-（４，４，５，５-テトラメチル-１，３，２-ジオキサボロラン-２-イル）フェニル）カルバメートの合成。前駆体実施例１、ステップ２からの生成物（３０ｇ、１３７mmol）及び二炭酸ジ-tert-ブチル（３８．９ｇ、１７８mmol）をトルエン（６００mL）中、１００℃で２４時間混合した。別の反応を上に記載されているように設定した。２つの反応混合物を合わせ、褐色混合物を蒸発させ、酢酸エチル（１．５L）に溶解し、０．１N HCl（３×２L）及びブライン（３L）で洗浄し、Na₂SO₄で脱水し、濾過し、減圧下で濃縮して、表題化合物を得た（５０ｇ、収率５７％）。¹H NMR（４００MHz, CDCl₃） 7.63 (br m, 2H), 7.48 (d, J=7.1 Hz, 1H), 7.37 - 7.28 (m, 1H), 1.52 (s, 9H), 1.34 (s, 12H)。Boc=tert-ブトキシカルボニル。

10

【０１６７】

ステップ４：tert-ブチル（３-（４-ホルミルベンジル）フェニル）カルバメートの合成。前駆体実施例１、ステップ１からの生成物（２４．９４ｇ、１２５mmol）、１，１'-ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセンジクロロパラジウム（II）ジクロロメタン複合体（１３．７５ｇ、１８．８０mmol）、前駆体実施例１、ステップ３からの生成物（２０ｇ、６２．７mmol）及び炭酸カリウム（４３．３ｇ、３１３mmol）のテトラヒドロフラン（４００mL）中混合物を８０℃に１２時間加熱した。別の追加反応を上に記載されているように設定した。２つの反応混合物を合わせ、水（５００mL）で希釈した。水性混合物を酢酸エチル（３×５００mL）で抽出した。有機層を合わせ、Na₂SO₄で脱水し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー（石油エーテル：酢酸エチル＝１０：１で溶出）で精製して、表題化合物を得た（１５ｇ、収率３８．４％）。¹H NMR（４００MHz, CDCl₃） 9.95 (s, 1H), 7.78 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.33 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.27 - 7.13 (m, 3H), 6.82 (d, J=7.1 Hz, 1H), 6.47 (br. s., 1H), 4.00 (s, 2H), 1.48 (s, 9H)。

20

30

【０１６８】

ステップ５：（６S, 8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R, 17S）-6, 9-ジフルオロ-11, 16, 17-トリヒドロキシ-17-（２-ヒドロキシアセチル）-10, 13-ジメチル-6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-ドデカヒドロ-3H-シクロペンタ[*a*]フェナントレン-3-オンの合成。（２S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 11aR, 12aS, 12bS）-2, 6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-（２-ヒドロキシアセチル）-6a, 8a, 10, 10-テトラメチル-1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-4H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-4-オン（２０ｇ、４４．２mmol）を４０％水性HBF₄（４４０mL）中に懸濁させ、混合物を２５℃で４８時間攪拌した。この反応が完了した後、２LのH₂Oを加え、固体を濾過によって収集した。この固体をH₂O（１L）、次いでメタノール（２００mL）で洗浄して、表題化合物を得た（１１ｇ、収率６０．３％）。¹H NMR（４００MHz, ジメチルスルホキシド-d₆） 7.25 (d, J=10.1 Hz, 1H), 6.28 (d, J=10.1 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.73 - 5.50 (m, 1H), 5.39 (br. s., 1H), 4.85 - 4.60 (m, 2H), 4.50 (d, J=19.4 Hz, 1H), 4.20 - 4.04 (m, 2H), 2.46 - 2.06 (m, 6H), 1.87 - 1.75 (m, 1H), 1.56 - 1.30 (m, 6H), 0.83 (s, 3H)。ジメチルスルホキシド=ジメチルスルホキシド。

40

【０１６９】

50

ステップ6：(2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10S, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル)フェニル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 4H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 4 - オンの合成。前駆体実施例1、ステップ5からの生成物(4.4g、10.67mmol)及びMgSO₄(6.42g、53.3mmol)のアセトニトリル(100mL)中懸濁液を20℃で1時間撹拌した。前駆体実施例1、ステップ4からの生成物(3.65g、11.74mmol)のアセトニトリル(100mL)中溶液を一度に加えた。氷浴を使用して内部温度を室温未満に維持しながら、トリフルオロメタンスルホン酸(9.01mL、53.3mmol)を滴下添加した。添加後、混合物を20℃で2時間撹拌した。3つの追加反応を上に記載されているように設定した。すべての4つの反応混合物を合わせ、濃縮し、残渣を分取HPLCで精製して、表題化合物を得た(4.5g、収率14.2%)。LCMS(方法a、表7)R_t = 2.65分; MS m/z = 606.2 (M + H)⁺。¹H NMR (400MHz, ジメチルスルホキシド-d₆) 7.44 - 7.17 (m, 5H), 6.89 (t, J=7.7 Hz, 1H), 6.44 - 6.25 (m, 4H), 6.13 (br. s., 1H), 5.79 - 5.52 (m, 2H), 5.44 (s, 1H), 5.17 - 4.89 (m, 3H), 4.51 (d, J=19.4 Hz, 1H), 4.25 - 4.05 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.17 (br. s., 1H), 2.75 - 2.55 (m, 1H), 2.36 - 1.97 (m, 3H), 1.76 - 1.64 (m, 3H), 1.59 - 1.39 (m, 4H), 0.94 - 0.78 (m, 3H)。分取HPLC方法：装置：Gilson 281半分取HPLCシステム；移動相：A：ギ酸/H₂O = 0.01% v/v；B：アセトニトリル；カラム：Luna C18 150 × 2.55ミクロン；流量：25mL/分；モニター波長：220及び254nm。

【0170】

【表8】

表9. 溶出液Bに対する移動相条件

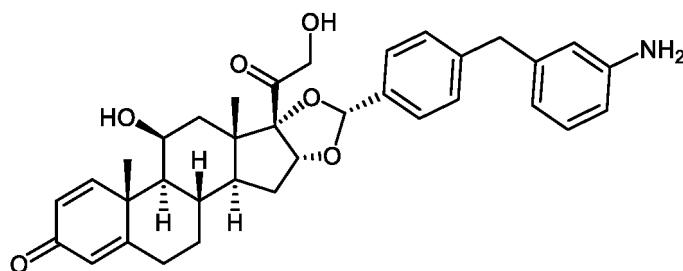
時間(分)	0.0	10.5	10.6	10.7	13.7	13.8	15.0
B%	15	35	35	100	100	10	10

【0171】

[前駆体実施例2] (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル)フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 4H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 4 - オンの合成。

【0172】

【化23】



【0173】

(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 11aR, 12aS, 12bS) - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a, 10, 10 - テトラメチル

- 1, 2, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 1 1 a, 1 2, 1 2 a, 1 2 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2', 1' : 4, 5] インデノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 4 - オンを使用して、前駆体実施例 2 生成物を、前駆体実施例 1 と類似の手順で合成した。

¹H NMR (400MHz, ジメチルスルホキシド-d₆) 7.36 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.31 (d, J=10.1 Hz, 1H), 7.20 (d, J=7.9 Hz, 2H), 6.89 (t, J=7.9 Hz, 1H), 6.39 - 6.28 (m, 3H), 6.16 (dd, J=1.5, 9.9 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 5.08 (t, J=5.7 Hz, 1H), 4.98 - 4.87 (m, 3H), 4.78 (d, J=3.1 Hz, 1H), 4.49 (dd, J=6.2, 19.4 Hz, 1H), 4.29 (br. s., 1H), 4.17 (dd, J=5.5, 19.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 2.61 - 2.53 (m, 1H), 2.36 - 2.26 (m, 1H), 2.11 (d, J=11.0 Hz, 1H), 2.07 (s, 1H), 2.02 (d, J=12.8 Hz, 1H), 1.83 - 1.54 (m, 5H), 1.39 (s, 3H), 1.16 - 0.96 (m, 2H), 0.85 (s, 3H). LCMS (方法 a、表 7) R_t = 2.365 分; m/z = 570.2 (M + H)⁺.

10

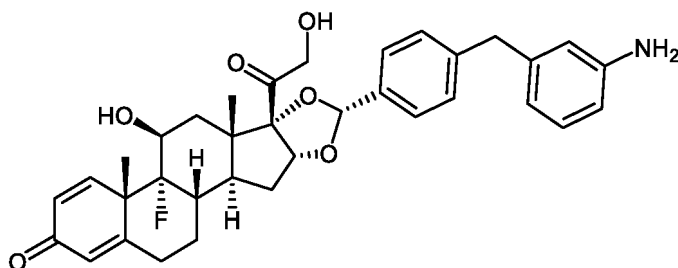
20

【 0 1 7 4 】

[前駆体実施例 3] (6 a S, 6 b R, 7 S, 8 a S, 8 b S, 1 0 R, 1 1 a R, 1 2 a S, 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a - ジメチル - 1, 2, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 1 1 a, 1 2, 1 2 a, 1 2 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2', 1' : 4, 5] インデノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 4 - オンの合成。

【 0 1 7 5 】

【 化 2 4 】



30

【 0 1 7 6 】

(6 a S, 6 b R, 7 S, 8 a S, 8 b S, 1 1 a R, 1 2 a S, 1 2 b S) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a, 1 0, 1 0 - テトラメチル - 1, 2, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 1 1 a, 1 2, 1 2 a, 1 2 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2', 1' : 4, 5] インデノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 4 - オンを使用して、前駆体実施例 3 生成物を、前駆体実施例 1 と類似の手順で合成した。

¹H NMR (400MHz, ジメチルスルホキシド-d₆) 7.37 - 7.26 (m, 3H), 7.21 (d, J=7.9 Hz, 2H), 6.89 (t, J=7.7 Hz, 1H), 6.43 - 6.30 (m, 3H), 6.23 (d, J=10.1 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.09 (t, J=5.7 Hz, 1H), 4.93 (br. s., 3H), 4.50 (dd, J=6.2, 19.4 Hz, 1H), 4.28 - 4.09 (m, 2H), 3.74 (s, 2H), 2.73 - 2.54 (m, 2H), 2.35 (d, J=13.2 Hz, 1H), 2.25 - 2.12 (m, 1H), 2.05 (d, J=15.0 Hz, 1H), 1.92 - 1.77 (m, 1H), 1.74 - 1.58 (m, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.45 - 1.30 (m, 1H), 0.87 (s, 3H). LCMS (方法 a、表 7) R_t = 2.68 分; m/z = 588.1 (M + H)⁺.

40

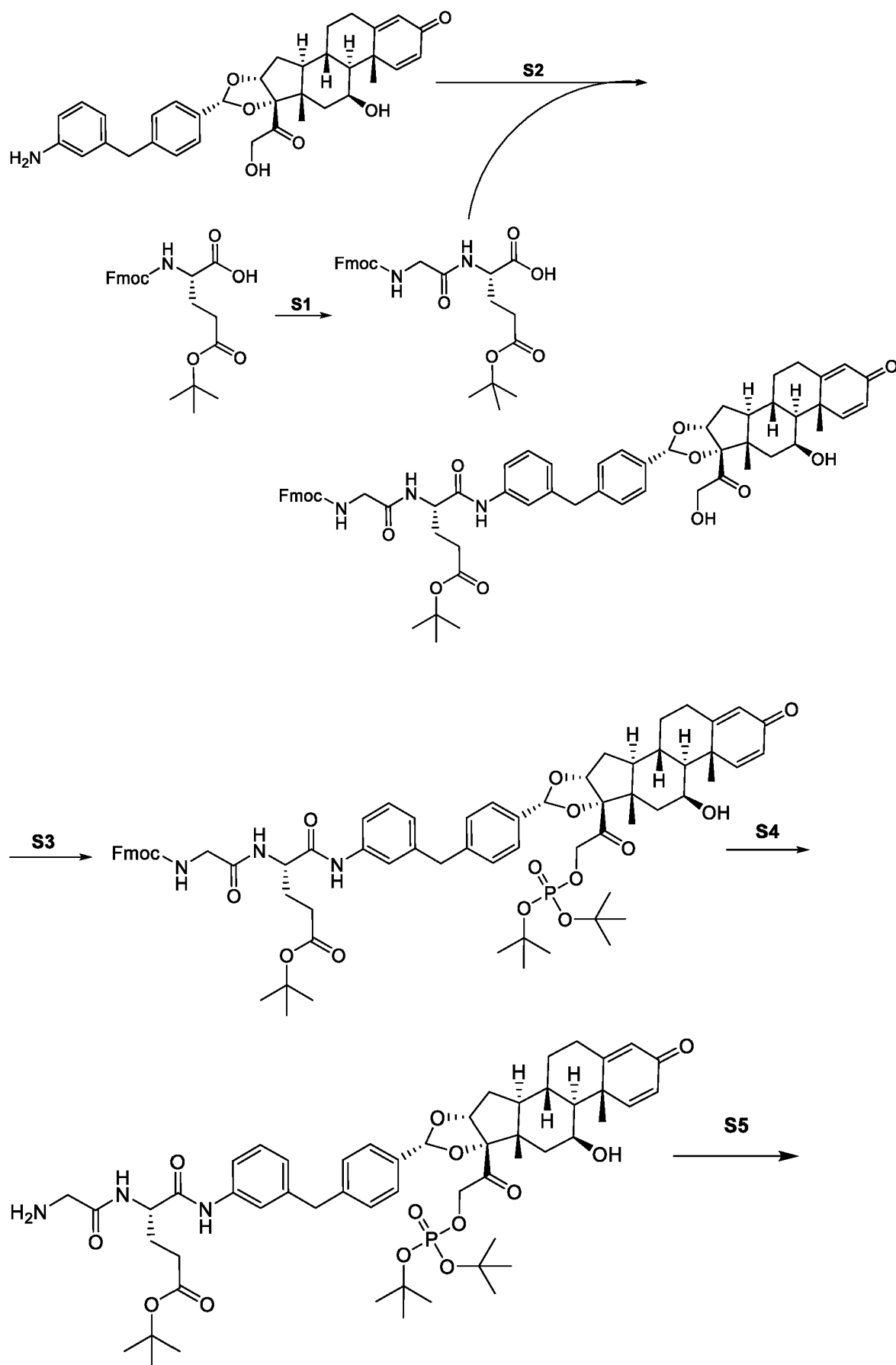
【 0 1 7 7 】

[前駆体実施例 4] (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R, 6 b S, 7 S, 8 a S, 8 b S, 1 0 R, 1 1 a R, 1

50

2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 8 b - (2
- (ホスホノオキシ) アセチル) - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a ,
1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5
- オキソペンタン酸の合成
【 0 1 7 8 】

【化 2 5】

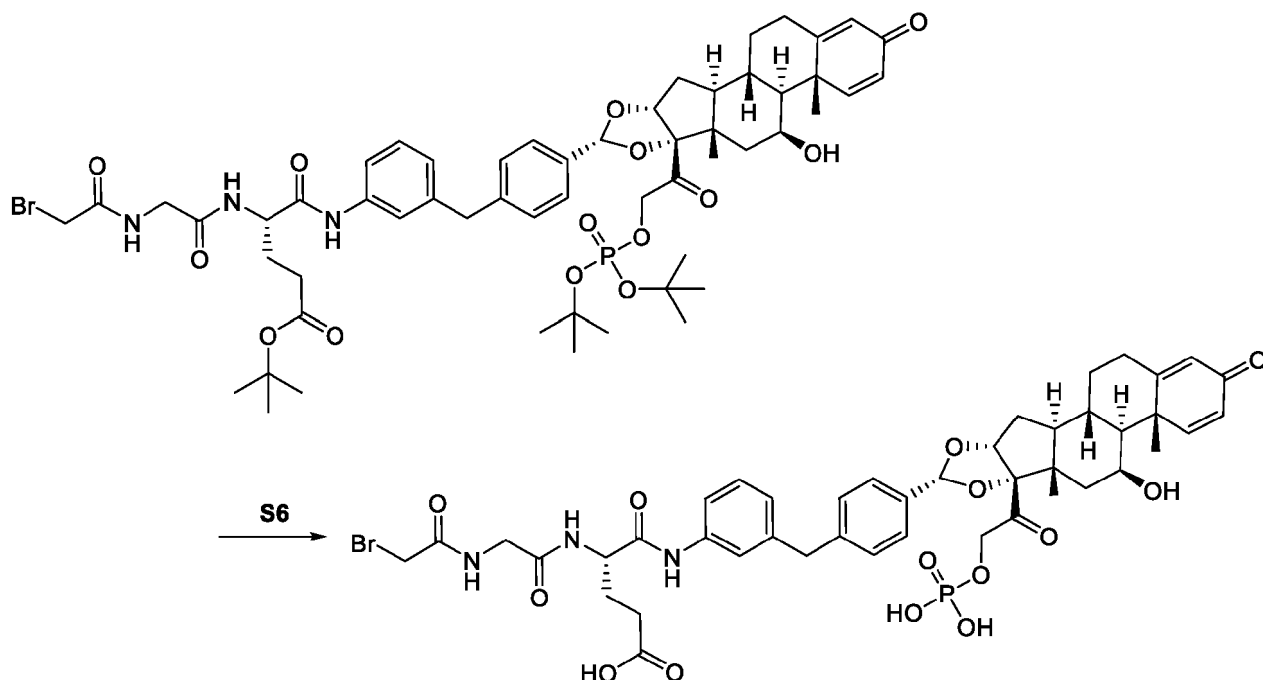


10

20

30

40



10

20

30

40

50

【 0 1 7 9 】

ステップ 1 : (S) - 2 - (2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) アセトアミド) - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキシペンタン酸の合成。2 - クロロトリチル塩化物樹脂 (3 0 g 、 9 2 m m o l) 、トリエチルアミン (4 6 . 4 g 、 4 5 8 m m o l) 及び (S) - 2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキシペンタン酸 (2 5 . 5 g 、 6 0 m m o l) の乾燥ジクロロメタン (2 0 0 m L) 中混合物を N_2 で、20 で 8 時間バブリングした。混合物を濾過し、樹脂をジクロロメタン ($2 \times 2 0 0$ m L) 、メタノール (M e O H) ($2 \times 2 0 0$ m L) 、及びジメチルホルムアミド ($2 \times 2 0 0$ m L) で洗浄した。樹脂をピペリジン : ジメチルホルムアミドの溶液 (1 : 4 、 4 0 0 m L) に加え、混合物を N_2 で 8 分間バブリングし、次いで濾過した。この作業を 5 回繰り返して、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル (F m o c) 保護基の完全な除去を得た。樹脂をジメチルホルムアミド ($5 \times 5 0 0$ m L) で洗浄して、樹脂結合した (S) - 2 - アミノ - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキシペンタン酸を生成した。2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) 酢酸 (1 3 . 3 8 g 、 4 5 . 0 m m o l) 、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (7 . 8 6 m L 、 4 5 m m o l) 、ヒドロキシベンゾトリアゾール (6 . 8 9 g 、 4 5 m m o l) 、2 - (6 - クロロ - 1 H - ベンゾ [d] [1 , 2 , 3] トリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルイソウロニウムヘキサフルオロホスフェート (V) (1 8 . 6 2 g 、 4 5 . 0 m m o l) のジメチルホルムアミド (2 0 0 m L) 中混合物を 20 で 3 0 分間攪拌した。混合物に、樹脂結合した (S) - 2 - アミノ - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキシペンタン酸を加え、生成した混合物を N_2 で、25 で 1 . 5 時間バブリングした。混合物を濾過し、樹脂をジメチルホルムアミド ($4 \times 5 0 0$ m L) 、及びジクロロメタン ($2 \times 5 0 0$ m L) で洗浄した。混合物に、1 % トリフルオロ酢酸 / ジクロロメタン ($5 \times 5 0 0$ m L) を加え、 N_2 で 5 分間バブリングした。混合物を濾過し、濾液を $N a H C O_3$ (2 0 0 m L) の飽和溶液に直接加えた。合わせた混合物を分離し、有機相をクエン酸飽和水溶液 ($4 \times 4 0 0$ m L) 及びブライン ($2 \times 3 0 0$ m L) で洗浄した。最終有機溶液を $N a_2 S O_4$ (2 0 g) で脱水し、濾過し、減圧下で濃縮して、表題化合物を生成した (1 0 g 、収率 2 0 %) 。 1H NMR : ($C D C l_3$, 400 MHz) 7.75 (d , J = 7.5 Hz , 2H) , 7.59 (b r d , J = 7.5 Hz , 2H) , 7.41 - 7.36 (m , 2H) , 7.30 (t , J = 7.0 Hz , 2H) , 5.82 (b r s , 1H) , 4.57 (b r d , J = 4.8

Hz, 1H), 4.38 (br d, J = 7.5 Hz, 2H), 4.27 - 4.15 (m, 1H), 4.06 - 3.83 (m, 2H), 2.50 - 2.29 (m, 2H), 2.26 - 2.13 (m, 1H), 2.06 - 2.02 (m, 1H), 1.43 (s, 9H).

【0180】

ステップ2: tert-ブチル(S)-4-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタノエートの合成。実施例4、ステップ1からの生成物(424mg、0.878mmol)のジメチルホルムアミド(3.5mL)中溶液に、実施例2(500mg、0.878mmol)及びトリエチルアミン(0.3mL、2.63mmol)を25℃で加えた。溶液を0℃に冷却し、次いで2, 4, 6-トリプロピル-1, 3, 5, 2, 4, 6-トリオキサトリホスフィナン2, 4, 6-トリオキシド(1.12g、1.755mmol)を加えた。反応混合物を25℃で12時間撹拌した。LCMSは反応が完了したことを示した。14種の追加反応を上に記載されているように設定した。すべての15種の反応混合物を合わせた。混合物を逆相カラムで精製して、表題化合物を黄色の固体として生成した(5g、収率38.4%)。逆相カラム法: 装置: Shimadzu LC-8A 分取HPLC; カラム: Phenomenex Luna C18 200×40mm×10µm; 移動相: H₂O(0.05%トリフルオロ酢酸)に対してA及びアセトニトリルに対してB; 勾配: B30%~100%で30分間; 流量: 60mL/min; 波長: 220&254nm。LCMS(方法a、表7)R_t=1.34分; m/z 1016.6(M+H)⁺。

10

20

【0181】

ステップ3: tert-ブチル(S)-4-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-7-ヒドロキシ-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタノエートの合成。実施例4、ステップ2からの生成物(400mg、0.387mmol)のジメチルホルムアミド(2.5mL)中溶液に、1H-テトラゾール(271mg、3.87mmol)及びジ-tert-ブチルジエチルホスホラミダイト(1.16g、4.64mmol)を加えた。反応物を室温で2.5時間撹拌し、次いで0℃に冷却した。過酸化水素(241mg、2.127mmol)を生成した混合物に加え、室温まで温め、1時間撹拌し、この後、LCMSは反応が完了したことを示した。11種の追加の反応を上に記載されているように設定した。すべての12種の反応混合物を合わせた。混合物を逆相カラムで精製して、表題化合物を生成した(4.4g、収率64.2%)。逆相カラム法: 装置: Shimadzu LC-8A 分取HPLC; カラム: Phenomenex Luna C18 200×40mm×10µm; 移動相: H₂Oに対してA及びアセトニトリルに対してB; 勾配: B50%~100%で30分; 流量: 60mL/min; 波長: 220&254nm。LCMS(方法a、表7)R_t=1.41分; m/z 1226.7(M+H)⁺。

30

40

【0182】

ステップ4: tert-ブチル(S)-4-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-7-ヒドロキシ-6a

50

, 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。実施例 4、ステップ 3 からの生成物 (1 . 1 g、0 . 8 9 7 m m o l) のアセトニトリル (6 m L) 中溶液に、ピペリジン (0 . 7 5 m L、7 . 5 8 m m o l) を 2 5 で加えた。反応物を室温で 2 0 分間攪拌し、その後、LCMS は反応が完了したことを示した。3 種の追加反応を上に記載されているように設定した。すべての 4 種の反応混合物を合わせた。混合物を濃縮して残渣を生成し、これを攪拌下で 2 時間、石油エーテル (1 0 m L) で処理した。生成した固体を濾過によって収集し、減圧下で乾燥させて、表題化合物を生成した (3 . 8 g、収率 9 0 %)。LCMS (方法 a、表 7) $R_t = 1 . 1 6$ 分; m/z 1 0 0 4 . 6 ($M+H$) $^+$ 。

【 0 1 8 3 】

ステップ 5 : t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。2 - プロモ酢酸 (9 7 m g、0 . 6 9 7 m m o l) のジメチルホルムアミド (2 . 5 m L) 中溶液に、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1 , 2 - ジヒドロキノリン (E E D Q) (1 7 2 m g、0 . 6 9 7 m m o l) を室温で加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌した。実施例 4、ステップ 4 からの生成物 (3 5 0 m g、0 . 3 4 9 m m o l) を加え、生成物を 2 . 5 時間攪拌した後、LCMS は反応が完了したことを示した。7 種の追加反応を上に記載されているように設定した。すべての 8 種の反応混合物を合わせた。反応物をジクロロメタン (1 0 0 m L) で希釈し、水性 H B r (1 M、2 x 8 0 m L)、水性 N a H C O ₃ (6 0 m L)、ブライン (6 0 m L) で洗浄した。有機層を N a ₂ S O ₄ で脱水し、濾過し、減圧下で濃縮して、表題化合物を生成した (2 g、収率 6 3 . 7 %)。LCMS (方法 a、表 7) $R_t = 1 . 3 0$ 分; m/z 1 1 2 6 . 4 ($M+H$) $^+$ 。

【 0 1 8 4 】

ステップ 6 : (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 8 b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸の合成。実施例 4、ステップ 5 からの生成物 (2 g、1 . 7 7 8 m m o l) のジクロロメタン (1 6 m L) 中溶液に、トリフルオロ酢酸 (8 m L、1 0 4 m m o l) を加え、生成した混合物を室温で 4 0 分間攪拌し、この後、LCMS は反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣を分取 H P L C で精製した。移動相をそのまま凍結乾燥して、表題化合物を生成した (6 4 0 m g、収率 3 5 . 3 %)。分取 H P L C 法: 装置: S h i m a d z u L C - 8 A 分取 H P L C ; カラム: P h e n o m e n e x L u n a C 1 8 2 0 0 x 4 0 m m x 1 0 μ m ; 移動相: H ₂ O (0 . 0 9 % トリフルオロ酢酸) に対して A 及びアセトニトリルに対して B ; 勾配: B 3 0 % ~ 4 0 % で 2 0 分; 流量: 6 0 m L / 分; 波長: 2 2 0 & 2 5 4 n m。¹H NMR: (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) 9.88 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.24 (br d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.46 (br d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.36 (br d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.30 (br d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.23 - 7.17 (m, 3H), 6.90 (br d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.16 (br d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 4.96 - 4.85 (m, 3H), 4.58 (br

dd, $J = 7.9, 18.7$ Hz, 1H), 4.38 (br d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.29 (br s, 1H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.80 (br s, 2H), 2.30 - 2.22 (m, 2H), 2.16 - 1.91 (m, 4H), 1.85 - 1.62 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.00 (br s, 2H), 0.87 (s, 3H). LCMS (方法 a、表 7) $R_t = 2.86$ 分; m/z 956.0、958.0 ($M+H$)⁺。

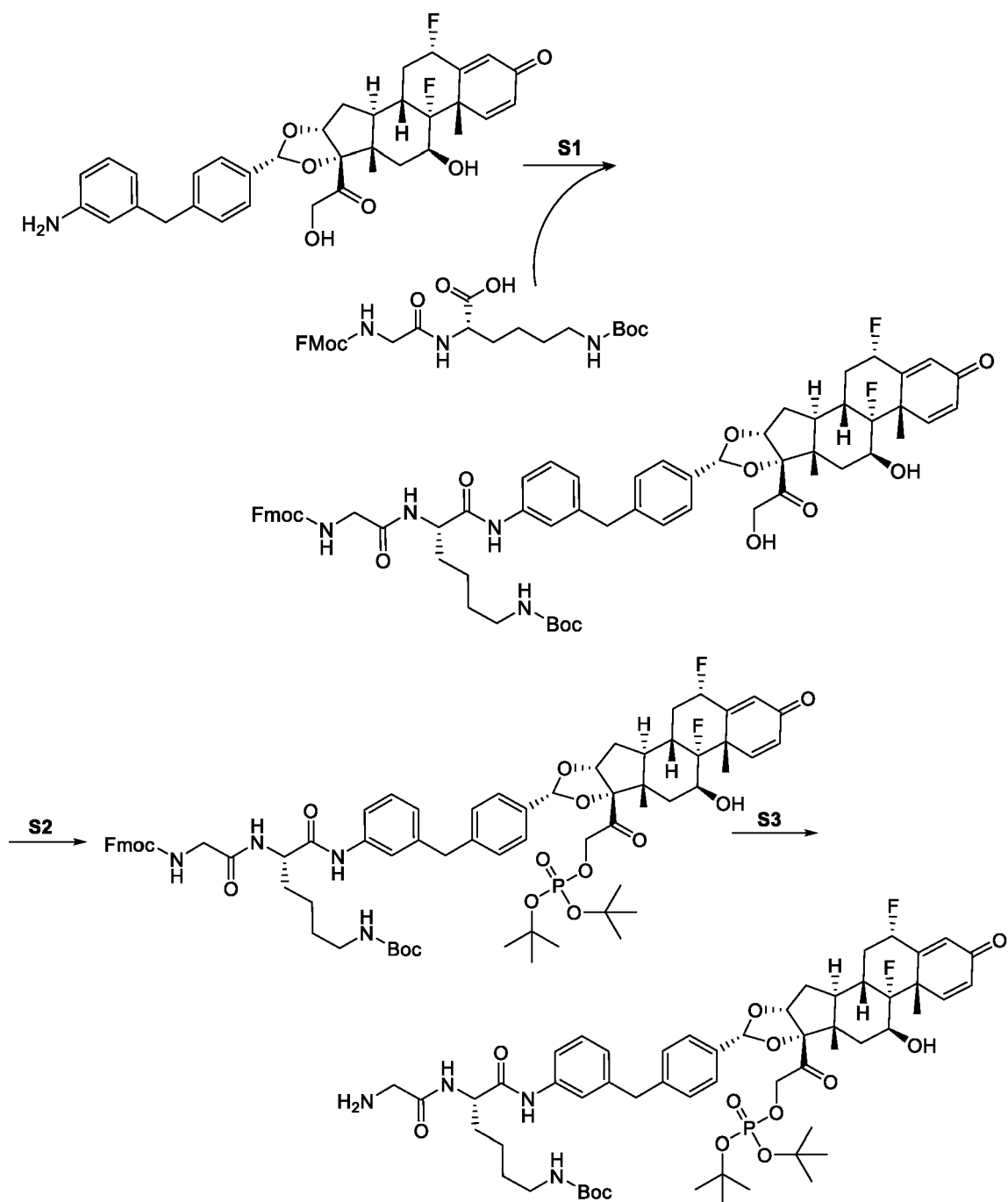
【0185】

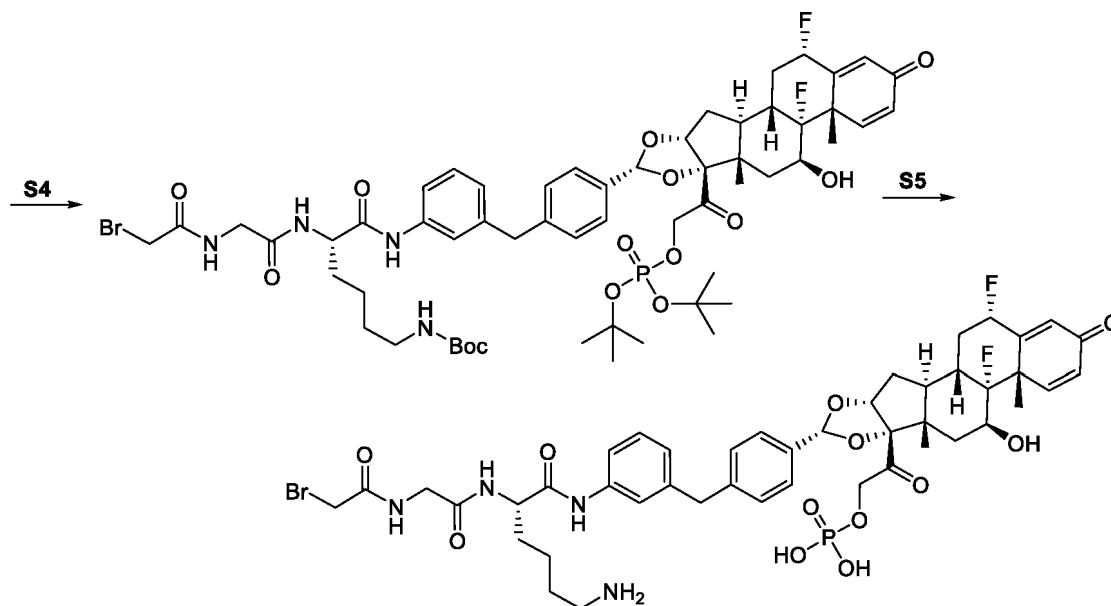
[前駆体実施例 5] 2 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) ヘキサンアミド) ベンジル) フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。

10

【0186】

【化 2 6】





10

【0187】

ステップ1: *tert*-ブチル((*S*)-5-(2-(((9*H*-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-6-((3-(4-((2*S*, 6*aS*, 6*bR*, 7*S*, 8*aS*, 8*bS*, 10*R*, 11*aR*, 12*aS*, 12*bS*)-2, 6*b*-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8*b*-(2-ヒドロキシアセチル)-6*a*, 8*a*-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6*a*, 6*b*, 7, 8, 8*a*, 8*b*, 11*a*, 12, 12*a*, 12*b*-ドデカヒドロ-1*H*-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-*d*][1, 3]ジオキサール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメートの合成。N²-((((9*H*-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)グリシル)-N6-(*tert*-ブトキシカルボニル)-L-リシン(5.58 g、8.26 mmol)のジメチルホルムアミド(60 mL)中溶液に、0 で、2, 4, 6-トリプロピル-1, 3, 5, 2, 4, 6-トリオキサトリホスフィナン2, 4, 6-トリオキシド(10.51 g、16.51 mmol)及びトリエチルアミン(3.45 mL、24.77 mmol)を加えた。生成した混合物を室温で1時間攪拌し、次いで前駆体実施例1、ステップ6からの生成物(5 g、8.26 mmol)を加えた。生成した混合物を室温で5時間攪拌し、この後、LCMSは反応が完了したことを示した。6種の追加反応を上に記載されているように設定した。すべての7種の反応混合物を合わせた。反応物を逆相カラムで精製して、表題化合物を生成した(24 g、収率24.62%)。逆相カラム法: 装置: Shimadzu LC-8A分取HPLC; カラム: Phenomenex Luna C18 200×40 mm×10 μm; 移動相: H₂O(0.05%トリフルオロ酢酸)に対してA及びアセトニトリルに対してB; 勾配: B30%~100%で30分; 流量: 60 mL/分; 波長: 220 & 254 nm。LCMS(方法a、表7)R_t=1.29分; m/z 1095.6(M+H-18)⁺。Fmoc=フルオレニルメチルオキシカルボニル; Boc=*tert*ブトキシカルボニル。

20

30

40

【0188】

ステップ2: *tert*-ブチル((*S*)-5-(2-(((9*H*-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-6-((3-(4-((2*S*, 6*aS*, 6*bR*, 7*S*, 8*aS*, 8*bS*, 10*R*, 11*aR*, 12*aS*, 12*bS*)-8*b*-(2-((ジ-*tert*-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-2, 6*b*-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-6*a*, 8*a*-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6*a*, 6*b*, 7, 8, 8*a*, 8*b*, 11*a*, 12, 12*a*, 12*b*-ドデカヒドロ-1*H*-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-*d*][1, 3]ジオキサール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメートの合成。実施例5、ステ

50

ップ1からの生成物(3 g、2.69 mmol)のジメチルホルムアミド(30 mL)中溶液に、1 H - テトラゾール(1.888 g、26.9 mmol)及びジ - tert - ブチルジエチルホスホラミダイト(8.06 g、32.3 mmol)を加え、反応物を室温で3.5時間撹拌した。過酸化水素(224 mg、1.97 mmol)を反応物に加え、0.5時間撹拌し、この後、LCMSは反応が完了したことを示した。6種の追加反応を上に記載されているように設定した。すべての7種の反応混合物を合わせた。反応物を逆相カラムで精製して、表題化合物を生成した(10 g、純度：78%、収率37.1%)。逆相カラム法：装置：Shimadzu LC-8A 分取HPLC；カラム：Phenomenex Luna C18 200×40 mm×10 μm；移動相：H₂Oに対してA及びアセトニトリルに対してB；勾配：B50%～100%で30分；流量：60 mL/分；波長：220&254 nm。LCMS(方法a、表7) R_t = 1.42分；m/z 1305.7 (M+H)⁺。

10

【0189】

ステップ3：tert - ブチル((S) - 5 - (2 - アミノアセトアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル)ベンジル)フェニル)アミノ) - 6 - オキソヘキシル)カルバメートの合成。実施例5、ステップ2からの生成物(2.5 g、1.969 mmol)のアセトニトリル(10 mL)中溶液に、ピペリジン(2 mL、1.969 mmol)を加え、反応物を室温で1時間撹拌し、この後LCMSは反応が完了したことを示した。3つの追加反応を上に記載されているように設定した。すべての4種の反応混合物を合わせた。反応物を濃縮して、粗生成物を生成し、これを石油エーテル(30 mL)中で2時間撹拌した。生成した固体を濾過によって収集し、減圧下で乾燥させて、表題化合物を黄色の固体として生成した(7 g、純度：83%、収率70.4%)。LCMS(方法a、表7) R_t = 1.17 min；m/z 1083.5 (M+H)⁺。

20

【0190】

ステップ4：tert - ブチル((S) - 5 - (2 - (2 - プロモアセトアミド)アセトアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル)ベンジル)フェニル)アミノ) - 6 - オキソヘキシル)カルバメートの合成。2 - プロモ酢酸(0.929 g、6.68 mmol)のジメチルホルムアミド(35 mL)中溶液に、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1, 2 - ジヒドロキノリン(1.653 g、6.68 mmol)を加え、生成した混合物を室温で1時間撹拌した。実施例5、ステップ3からの生成物(3.5 g、3.34 mmol)を加え、生成した混合物を室温で2時間撹拌した。LCMSは反応が完了したことを示した。反応物をジクロロメタン(100 mL)で希釈し、水性HBr(1 M、2×80 mL)、水性NaHCO₃(60 mL)及びブライン(60 mL)を洗浄した。有機層をNa₂SO₄で脱水し、濾過し、減圧下で濃縮して、表題化合物を生成した(2 g、収率51.2%)。LCMS(方法a、表7) R_t = 1.32分；m/z 1205.5 (M+H)⁺。

30

40

【0191】

ステップ5：2 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - (2 - (2 - プロモアセトアミド)アセトアミド)ヘキサンアミド)ベンジル)フェニル) - 2, 6

50

b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。実施例 5、ステップ 4 からの生成物 (2 g、1.661 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 中溶液に、トリフルオロ酢酸 (5 mL、64.9 mmol) を加え、反応物を室温で 40 分間攪拌し、この後、LCMS は反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物を分取 HPLC で精製した。移動相をそのまま凍結乾燥して、表題化合物を生成した (550 mg、純度 : 96.9 %、収率 32.3 %)。分取 HPLC 方法 : 装置 : Shimadzu LC-8A 分取 HPLC ; カラム : Phenomenex Luna C18 200 x 4.0 mm x 100 μm ; 移動相 : H₂O (0.09 % トリフルオロ酢酸) に対して A 及びアセトニトリルに対して B ; 勾配 : B 30 % ~ 40 % で 20 分 ; 流量 : 60 mL / 分 ; 波長 : 220 & 254 nm。LCMS (方法 a、表 7) R_t = 2.31 分。¹H NMR: (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) ppm 0.90 (s, 3 H) 1.19 - 1.41 (m, 2 H) 1.43 - 1.62 (m, 7 H) 1.64 - 1.77 (m, 3 H) 1.84 (br d, J=14.55 Hz, 1 H) 1.95 - 2.07 (m, 1 H) 2.18 - 2.36 (m, 3 H) 2.65 - 2.78 (m, 3 H) 3.71 - 3.86 (m, 3 H) 3.89 (s, 2 H) 3.93 (s, 2 H) 4.20 (br d, J=9.48 Hz, 1 H) 4.33 - 4.41 (m, 1 H) 4.59 (br dd, J=18.41, 8.05 Hz, 1 H) 4.81 (br dd, J=18.52, 8.60 Hz, 1 H) 4.94 (d, J=4.63 Hz, 1 H) 5.50 (s, 1 H) 5.54 - 5.76 (m, 1 H) 6.13 (s, 1 H) 6.29 (dd, J=10.14, 1.32 Hz, 1 H) 6.95 (d, J=7.72 Hz, 1 H) 7.15 - 7.28 (m, 4 H) 7.30 - 7.41 (m, 3 H) 7.51 (br d, J=7.94 Hz, 1 H) 7.72 (br s, 3 H) 8.21 (br d, J=7.72 Hz, 1 H) 8.54 (t, J=5.62 Hz, 1 H) 9.93 (br d, J=2.65 Hz, 1 H)。

10

20

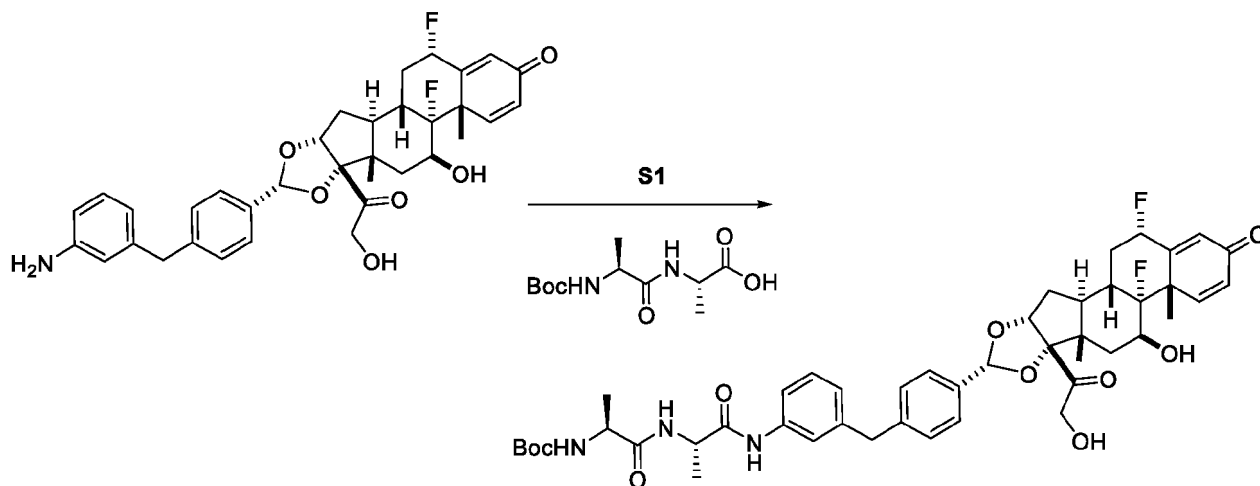
【 0 1 9 2 】

[前駆体実施例 6] (S) - N - (3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) - 2 - ((S) - 2 - (3 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) プロパンアミド) プロパンアミド) プロパンアミドの合成。

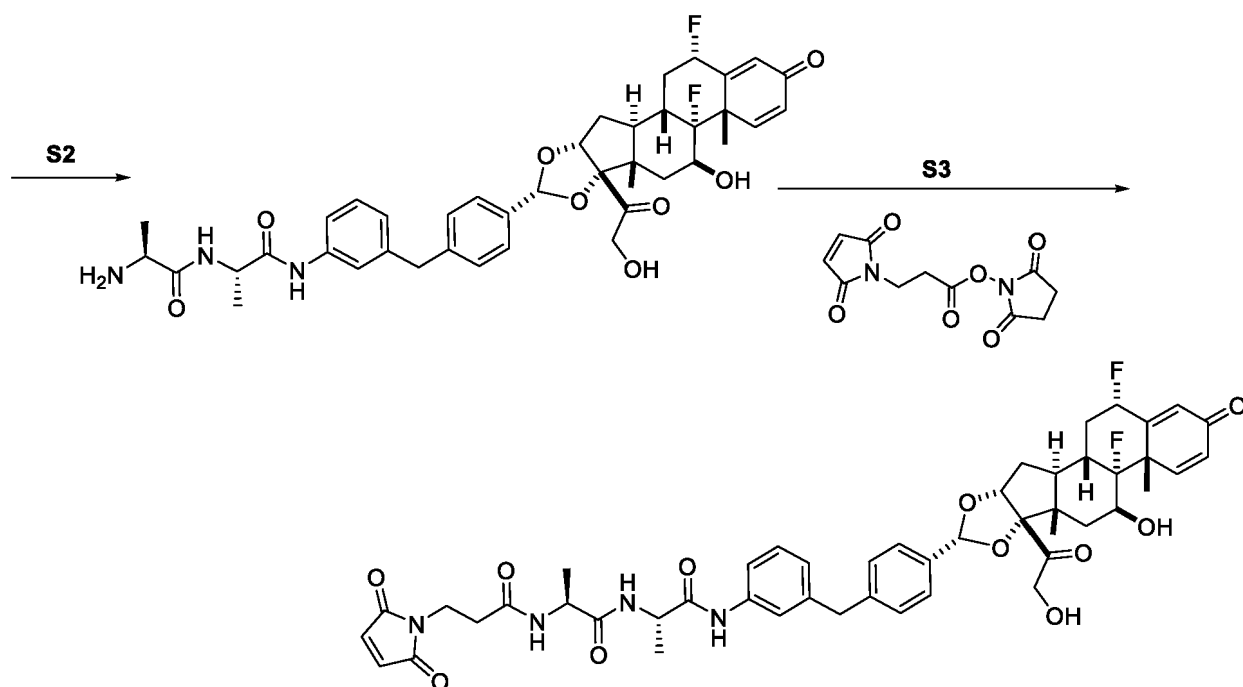
30

【 0 1 9 3 】

【 化 2 7 】



40



10

20

30

40

50

【0194】

ステップ1: *tert*-ブチル((*S*)-1-((*S*)-1-((3-(4-((2*S*, 6*aS*, 6*bR*, 7*S*, 8*aS*, 8*bS*, 10*R*, 11*aR*, 12*aS*, 12*bS*)-2, 6*b*-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8*b*-(2-ヒドロキシアセチル)-6*a*, 8*a*-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6*a*, 6*b*, 7, 8, 8*a*, 8*b*, 11*a*, 12, 12*a*, 12*b*-ドデカヒドロ-1*H*-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-*d*][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメートの合成。1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1*H*-1, 2, 3-トリアゾロ[4, 5-*b*]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート(HATU)(610mg、1.605mmol)及び2, 6-ルチジン(0.3mL、2.58mmol)を、室温で、前駆体実施例1、ステップ6からの生成物(648.1mg、1.070mmol)、及び(*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-ブトキシカルボニル)アミノ)プロパンアミド)プロパン酸(334mg、1.284mmol)のTHF(11.5mL)中混合物に加えた。9時間後、反応物を酢酸エチル(16mL)で希釈し、次いでHClの1*N*水溶液(3×4mL)、これに続いてブラインの飽和水性溶液(4mL)で洗浄した。0~10%メタノール/ジクロロメタンの勾配で溶出するクロマトグラフィー(シリカ、40g)での精製により表題化合物を得た(773.7mg、0.912mmol、85%収率)。LCMS(方法b、表7) $R_t = 0.92$ 分、 $m/z = 848.53$ [$M + H^+$]。

【0195】

ステップ2: (*S*)-2-アミノ-N-((*S*)-1-((3-(4-((2*S*, 6*aS*, 6*bR*, 7*S*, 8*aS*, 8*bS*, 10*R*, 11*aR*, 12*aS*, 12*bS*)-2, 6*b*-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8*b*-(2-ヒドロキシアセチル)-6*a*, 8*a*-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6*a*, 6*b*, 7, 8, 8*a*, 8*b*, 11*a*, 12, 12*a*, 12*b*-ドデカヒドロ-1*H*-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-*d*][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミドの合成。トリフルオロ酢酸(1.97mL、25.6mmol)を、実施例6、ステップ1からの生成物(0.7683g、0.906mmol)のジクロロメタン(6.0mL)中室温溶液に滴下添加した。50分後、溶媒を減圧下で除去して、褐色のシロップを得た。残渣を1:1ジメチルスルホキシド:メタノール(

12 mL) に溶解し、Phenomenex C18 (2) 10 ミクロンカラム (250 × 50 mm カラム) による逆相 HPLC で精製した。アセトニトリル (A) 及び水中 0.1% トリフルオロ酢酸 (B) の勾配を、流量 90 mL / 分 (0 ~ 5.0 分、15% A、5.0 ~ 20 分、線型勾配 15 ~ 75% A、2 分保持、22.0 ~ 22.5 分、線型勾配 75 ~ 95% A、4 分保持) で使用した。合わせた画分を減圧下で濃縮乾燥させて、残渣を真空オーブン内、50 °C で終夜乾燥させて、表題化合物を得た (230 mg、0.308 mmol、34% 収率)。LC-MS (方法 b、表 7) 主要のアセタール異性体 $R_t = 0.73$ 分、 $m/z = 748.78$ [M + H⁺]⁺。¹H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド-d₆) 10.01 (s, 1H), 8.62 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 7.46 - 7.31 (m, 4H), 7.31 - 7.13 (m, 4H), 6.91 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.76 - 5.47 (m, 2H), 5.43 (s, 1H), 4.93 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 19.5 Hz, 1H), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.23 - 4.13 (m, 2H), 2.72 - 2.54 (m, 1H), 2.33 - 2.16 (m, 2H), 2.02 (dt, J = 13.6, 3.6 Hz, 1H), 1.69 (h, J = 5.9, 5.1 Hz, 3H), 1.48 (s, 4H), 1.33 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.30 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.85 (s, 3H).

10

【0196】

ステップ 3: (S) - N - (3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4, 5] インデノ [1, 2-d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) - 2 - ((S) - 2 - (3 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) プロパンアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) の合成。ジイソプロピルエチルアミン (0.1 mL、0.573 mmol) を、室温で、実施例 6、ステップ 2 からの生成物 (0.220 g、0.294 mmol) 及び N - スクシンイミジル 3 - マレイミドプロピオネート (0.086 g、0.324 mmol) のジメチルホルムアミド (2.8 mL) 中溶液に加えた。30 分後、反応混合物の pH を、トリフルオロ酢酸の水 (1.0 mL) 中 7% 溶液の滴下添加により 4 ~ 5 に調節した。粗製混合物を Phenomenex C18 (2) 10 ミクロンカラム (250 × 50 mm カラム) による逆相 HPLC で精製した。アセトニトリル (A) 及び水中 0.1% トリフルオロ酢酸 (B) の勾配を流量 90 mL / 分 (0 ~ 5.0 分、15% A、5.0 ~ 20 分、線型勾配 15 ~ 85% A、2 分保持) で使用した。合わせた画分を減圧下で濃縮して、揮発性溶媒を除去し、生成した溶液を凍結し、凍結乾燥して、表題化合物を得た (175.2 mg、0.195 mmol、66% 収率)。LCMS (方法 b、表 7) $R_t = 0.82$ 分、 $m/z = 899.87$ [M + H⁺]⁺。¹H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド-d₆) 9.70 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.47 - 7.35 (m, 2H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.26 - 7.10 (m, 4H), 6.95 (s, 1H), 6.87 (dt, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 6.26 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.72 - 5.51 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.91 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 4.30 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 4.25 - 4.11 (m, 3H), 3.85 (s, 2H), 3.57 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.71 - 2.48 (m, 1H), 2.36 (dd, J = 8.0, 6.7 Hz, 2H), 2.23 (ddt, J = 25.1, 12.2, 6.6 Hz, 2H), 2.01 (dt, J = 13.7, 3.7 Hz, 1H), 1.75 - 1.57 (m, 3H), 1.48 (p, J = 11.9 Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.24 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.13 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 0.83 (s, 3H).

20

30

40

【0197】

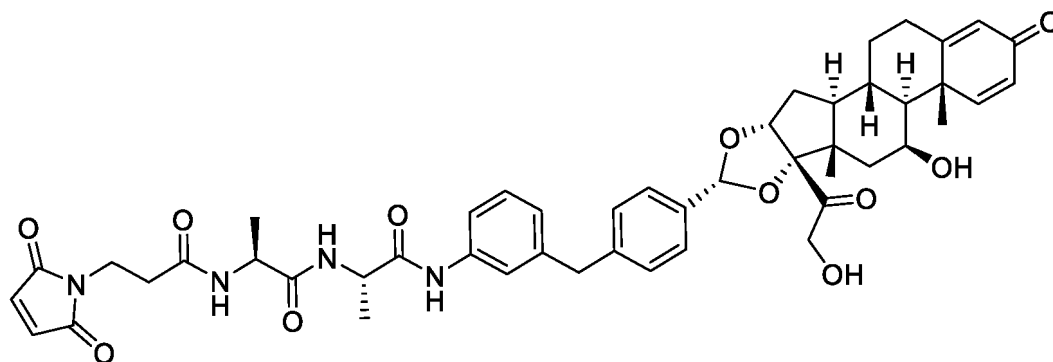
[前駆体実施例 7] 3 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1

50

-イル)-N-(S)-1-(S)-1-(3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミドの合成

【0198】

【化28】



10

【0199】

20

(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-アミノベンジル)フェニル)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-4H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-4-オンを使用して、前駆体実施例7生成物を、実施例6と類似の手順で合成した。LCMS(方法b、表7) $R_t = 0.85$ 分、 $m/z = 863.4$ [M+H]。

^1H NMR (501 MHz, ジメチルスルホキシド- d_6) 9.71 (s, 1H), 8.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 7.8, 1.1$ Hz, 2H), 7.38 - 7.32 (m, 2H), 7.29 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 7.22 - 7.15 (m, 3H), 6.96 (s, 2H), 6.88 (dt, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H), 6.13 (dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz, 1H), 5.90 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.90 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 19.4$ Hz, 1H), 4.32 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.27 (q, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.21 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.16 (d, $J = 19.4$ Hz, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.57 - 2.49 (m, 1H), 2.38 (dd, $J = 8.0, 6.6$ Hz, 2H), 2.32 - 2.24 (m, 1H), 2.15 - 2.04 (m, 1H), 2.04 - 1.95 (m, 1H), 1.80 - 1.54 (m, 5H), 1.37 (s, 3H), 1.26 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.02 (ddd, $J = 21.2, 12.1, 4.2$ Hz, 2H), 0.84 (s, 3H)。

30

40

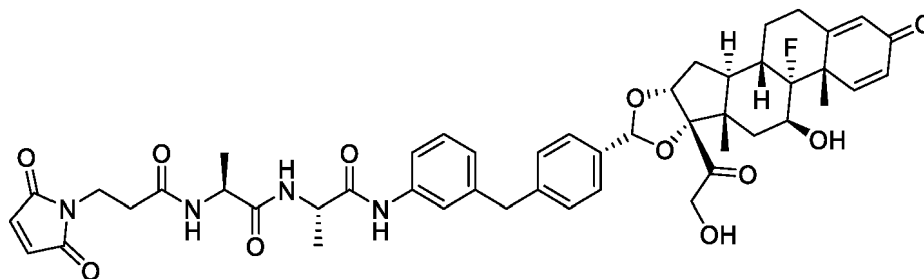
【0200】

[前駆体実施例8] 3-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-N-(S)-1-(S)-1-(3-(4-(6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-6b-フルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミドの合成。

【0201】

50

【化 2 9】



【 0 2 0 2 】

10

(6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S)
 - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ -
 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 1 , 2 , 6 a , 6 b , 7 ,
 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2 ' ,
 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 4 - オンを使用して、
 前駆体実施例 8 生成物を、実施例 6 と類似の手順で合成した。L C M S (方法 b 、 表 7)
 $R_t = 0.85$ 分 ; $m/z = 881.46$ [$M + H$] $^+$ 。

1H NMR (ジメチルスルホキシド- d_6) 0.83 (s , 3H) , 1.13 (d , $J = 7.1$ Hz , 3H) , 1.24 (d , $J = 7.1$ Hz , 3H) , 1.35 (qd , $J = 13.3$, 12.8 , 5.1 Hz , 1H) , 1.46 (s , 3H) , 1.63 (q , $J = 9.7$, 8.5 Hz , 3H) , 1.73 - 1.88 (m , 1H) , 2.01 (dt , $J = 13.7$, 3.5 Hz , 1H) , 2.14 (td , $J = 11.8$, 7.2 Hz , 1H) , 2.26 - 2.40 (m , 3H) , 2.48 - 2.69 (m , 2H) , 3.57 (t , $J = 7.3$ Hz , 2H) , 3.85 (s , 2H) , 4.17 (ddd , $J = 17.5$, 11.7 , 6.2 Hz , 3H) , 4.30 (p , $J = 7.2$ Hz , 1H) , 4.47 (d , $J = 19.4$ Hz , 1H) , 4.83 - 4.95 (m , 1H) , 5.40 (s , 2H) , 5.99 (d , $J = 1.6$ Hz , 1H) , 6.20 (d , $J = 10.1$, 1.9 Hz , 1H) , 6.87 (d , $J = 7.5$ Hz , 1H) , 6.95 (s , 2H) , 7.16 (t , $J = 7.9$ Hz , 1H) , 7.20 (d , $J = 8.1$ Hz , 2H) , 7.25 (d , $J = 10.1$ Hz , 1H) , 7.31 (d , $J = 8.0$ Hz , 2H) , 7.38 (d , $J = 1.9$ Hz , 1H) , 7.43 (dd , $J = 8.0$, 2.0 Hz , 1H) , 8.01 (d , $J = 7.3$ Hz , 1H) , 8.14 (d , $J = 7.1$ Hz , 1H) , 9.70 (s , 1H) .

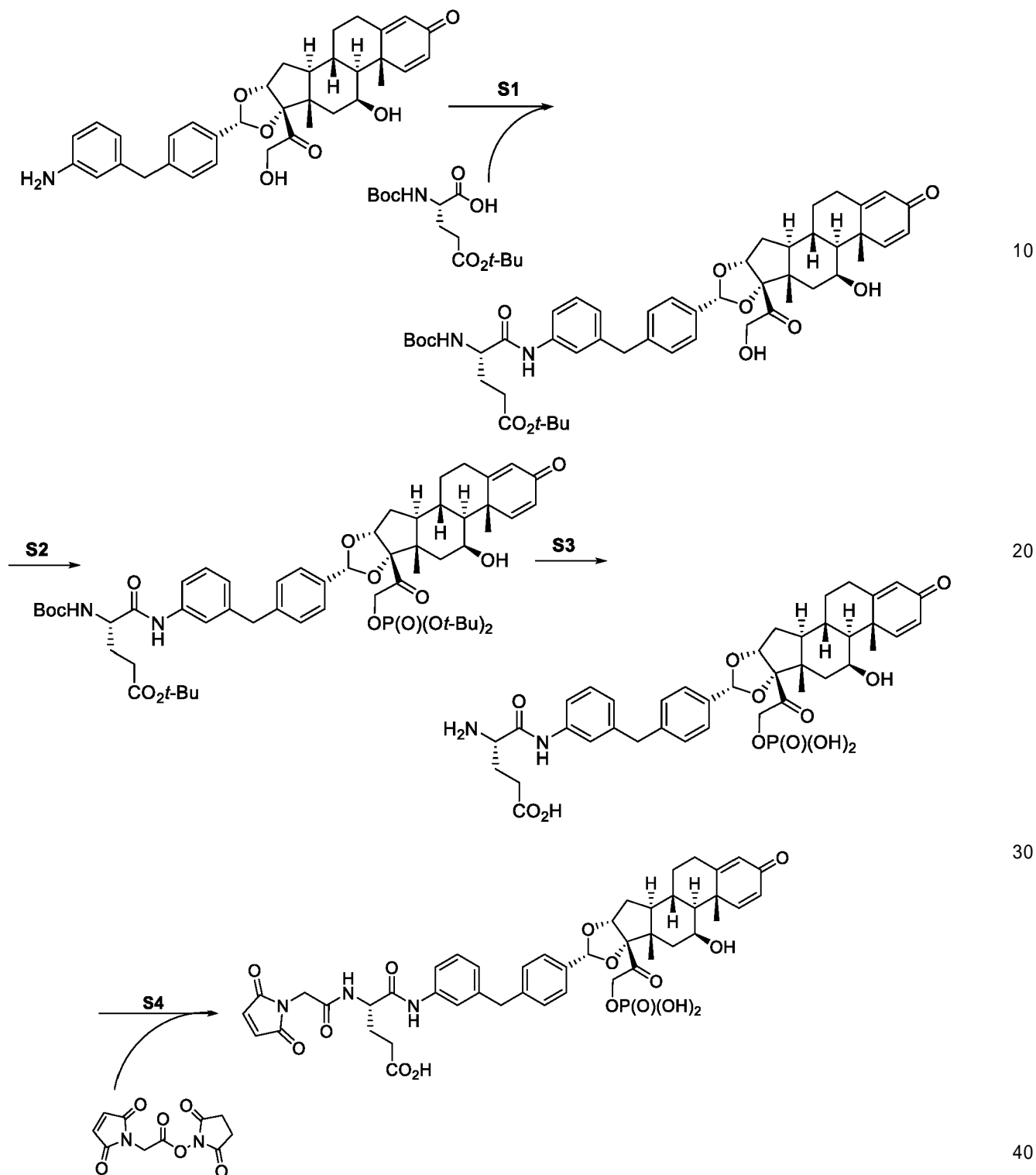
30

【 0 2 0 3 】

[前駆体実施例 9] (S) - 4 - (2 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 8 b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸の合成

【 0 2 0 4 】

【化 3 0】



【0205】

ステップ1: tert - ブチル (S) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ) - 5 - ((3 - (4 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。1 - [ビス(ジメチルアミノ)メチレン] - 1H - 1, 2, 3 - トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3 - オキシドヘキサフルオロホスフェート

(HATU) (260 mg、0.685 mmol) 及び 2, 6 - ジメチルピリジン (0.184 mL、1.580 mmol) を、前駆体実施例 2 からの生成物 (300 mg、0.527 mmol) 及び (S) - 5 - (tert - ブトキシ) - 2 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸 (168 mg、0.553 mmol) のジメチルホルムアミド (6 mL) 中室温懸濁液に加えた。室温で 2 時間後、反応物を酢酸エチル (30 mL) で希釈し、次いで HCl の 1 N 水溶液 (2 × 15 mL)、NaHCO₃ の飽和水溶液 (15 mL)、及びブライン (15 mL) で逐次的に洗浄した。有機層を脱水し (Na₂SO₄)、溶媒を減圧下で除去した。0 ~ 10 % メタノール / ジクロロメタンの勾配で溶出するクロマトグラフィー (シリカ) による精製により、表題化合物をオフホワイト色の固体として得た (400 mg、0.47 mmol、89 % 収率)。LCMS (方法 b、表 7) R_t = 1.09 分; MS m/z = 854.9 [M + H]⁺。

【0206】

ステップ 2: tert - ブチル (S) - 4 - ((tert - ブトキシカルボニル) アミノ) - 5 - ((3 - (4 - (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - (ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4, 5] インドノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。ジ - tert - ブチルジエチルホスホラミダイト (0.42 mL、1.5 mmol) を、前駆体実施例 9、ステップ 1 からの生成物 (400 mg、0.468 mmol) 及び 1H - テトラゾール (0.35 mL、2.25 mmol) のジメチルアセトアミド (5 mL) 中室温溶液に加えた。反応物を室温で 2 時間攪拌し、この時点で、過酸化水素の水 (1.5 mL) 中 50 % 溶液を滴下添加した。LCMS が、酸化が完了したことを示したら、反応物を 0 ° に冷却し、Na₂S₂O₃ の 1 M 水溶液 (8 mL) の添加によりクエンチした。混合物を酢酸エチル (2 × 30 mL) で抽出し、合わせた有機層をブライン (15 mL) で洗浄し、脱水し (Na₂SO₄)、濾過し、溶媒を減圧下で除去した。分取逆相 HPLC での精製により、表題化合物を得た (420 mg、0.40 mmol、86 % 収率)。LCMS (方法 b、表 7) R_t = 1.27 分; MS m/z = 1047.6 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド - d₆) 9.80 (s, 1H), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.37 - 7.31 (m, 3H), 7.29 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.11 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 5.89 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.00 - 4.81 (m, 3H), 4.58 (dd, J = 18.0, 9.1 Hz, 1H), 4.26 (s, 1H), 4.00 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.49 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 2.29 (p, J = 2.0 Hz, 1H), 2.27 - 2.16 (m, 2H), 2.06 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 1.98 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 1.91 - 1.56 (m, 6H), 1.39 (d, J = 1.5 Hz, 18H), 1.35 (s, 3H), 1.33 (s, 18H), 1.01 (t, J = 13.7 Hz, 2H), 0.85 (s, 3H)。

【0207】

ステップ 3: (S) - 4 - アミノ - 5 - ((3 - (4 - (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 8b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4, 5] インドノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸の合成。トリフルオロ酢酸 (2.0 mL、0.40 mmol) を、室温で前駆体実施例 9、ステップ 2 からの生成物 (420 mg、0.401 mmol) のジクロロメタン (6 mL) 中溶液に加えた。混合物を室温で 45 分間攪拌し、この時点で溶媒を減圧下で除去した。表題化合物はさらに精製せずに次のステップで使用した。LCMS (方法 a、表 7) 主要なアセタール異性体 R_t = 0

． 69 分、 $MS m/z = 779.8 [M+H]^+$ ；微量のアセタール異性体 $R_t = 0.72$ 分、 $MS m/z = 779.9 [M+H]^+$ 。

【0208】

ステップ4：(S)-4-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)アセトアミド)-5-((3-(4-(6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-8b-(2-(ホスホノオキシ)アセチル)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタン酸の合成。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.90 mL、5.1 mmol)及びマレイミド酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(141 mg、0.561 mmol)を、前駆体実施例9、ステップ3からの生成物(364 mg、0.467 mmol)のジメチルホルムアミド(5 mL)中室温溶液に逐次的に加えた。LCMSは、反応が15分間以内に完了したことを示し、この時点で反応物を0 に冷却し、2,2,2-トリフルオロ酢酸(0.432 mL、6.6 mmol)の添加によりpHを1に調節した。分取逆相HPLCでの精製及び凍結乾燥により、表題化合物を得た(146 mg、0.159 mmol、34%収率)。LCMS(方法b、表7) $R_t = 0.79$ 分； $MS m/z = 915.9 [M+H]^+$ 。¹H NMR(400 MHz, ジメチルスルホキシド-d₆) 9.92 (s, 1H), 8.45 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.43 - 7.38 (m, 1H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 3H), 7.28 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 8.3 Hz, 3H), 7.16 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.13 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 5.89 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.93 - 4.83 (m, 2H), 4.80 (s, 1H), 4.53 (dd, J = 18.2, 8.2 Hz, 1H), 4.34 (td, J = 8.1, 5.3 Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 2.58 - 2.48 (m, 1H), 2.34 - 2.16 (m, 3H), 2.16 - 2.03 (m, 1H), 2.03 - 1.84 (m, 2H), 1.84 - 1.53 (m, 4H), 1.36 (s, 3H), 1.01 (td, J = 13.1, 11.3, 4.0 Hz, 2H), 0.84 (s, 3H).

10

20

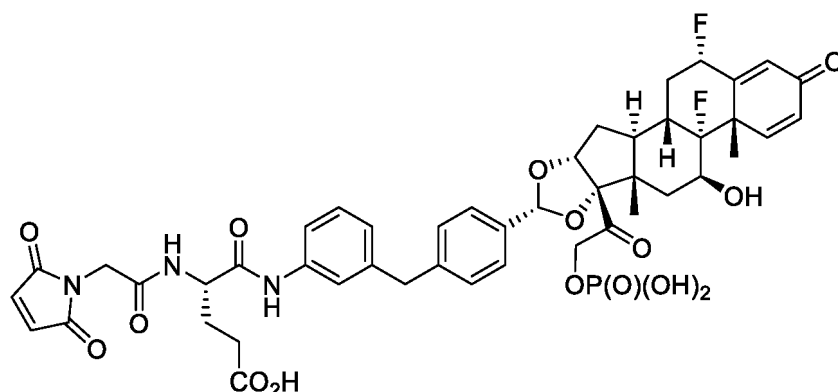
【0209】

[前駆体実施例10] (S)-4-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)アセトアミド)-5-((3-(4-(6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-8b-(2-(ホスホノオキシ)アセチル)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタン酸の合成。

30

【0210】

【化31】



40

【0211】

50

前駆体実施例 1、ステップ 6 からの生成物を使用して、前駆体実施例 10 生成物を前駆体実施例 9 と類似の手順で合成した。LCMS (方法 b、表 7) $R_t = 0.79$ 分; $MW m/z 974.3 [M + Na]^+$ 。

1H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド- d_6) 9.91 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.37 - 7.29 (m, 3H), 7.28 - 7.20 (m, 3H), 7.17 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 10.2, 1.8$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.67 (dd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 1H), 5.60 - 5.48 (m, 2H), 4.94 - 4.85 (m, 2H), 4.56 (dd, $J = 18.2, 8.4$ Hz, 1H), 4.34 (td, $J = 8.2, 5.4$ Hz, 1H), 4.23 - 4.13 (m, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 2.69 - 2.52 (m, 1H), 2.32 - 2.12 (m, 4H), 2.03 (dt, $J = 13.7, 3.7$ Hz, 1H), 1.96 - 1.85 (m, 1H), 1.83 - 1.60 (m, 4H), 1.55 - 1.41 (m, 4H), 0.85 (s, 3H).

10

20

30

40

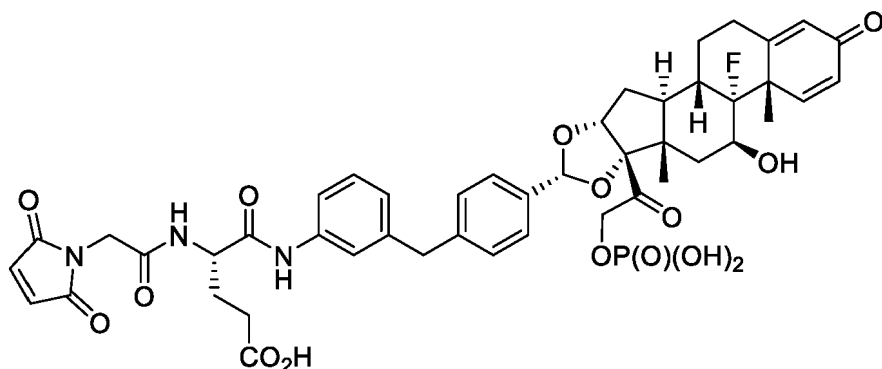
50

【0212】

[前駆体実施例 11] (S)-4-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)アセトアミド)-5-((3-(4-(6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-6b-フルオロ-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-8b-(2-(ホスホノオキシ)アセチル)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタン酸の合成。

【0213】

【化32】



【0214】

前駆体実施例 3 からの生成物を使用して、前駆体実施例 11 生成物を前駆体実施例 9 と類似の手順で合成した。LCMS (方法 b、表 7) $R_t = 0.80$ 分; $MW m/z 934 [M + H]^+$ 。

1H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド- d_6) 0.89 (s, 3H), 1.39 (dd, $J = 12.7, 5.1$ Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.67 (q, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.76 - 2.02 (m, 3H), 2.07 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 2.22 (dtd, $J = 16.7, 11.1, 10.4, 4.6$ Hz, 3H), 2.31 - 2.43 (m, 1H), 2.57 - 2.75 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 4.11 (s, 2H), 4.20 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.38 (td, $J = 8.2, 5.5$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J = 18.2, 8.3$ Hz, 1H), 4.84 - 5.00 (m, 2H), 5.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.24 (dd, $J = 10.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.88 - 6.99 (m, 1H), 7.09 (s, 2H), 7.15 - 7.32 (m, 4H), 7.32 - 7.42 (m, 3H), 7.42 - 7.53 (m, 1H), 8.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 9.95 (s, 1H).

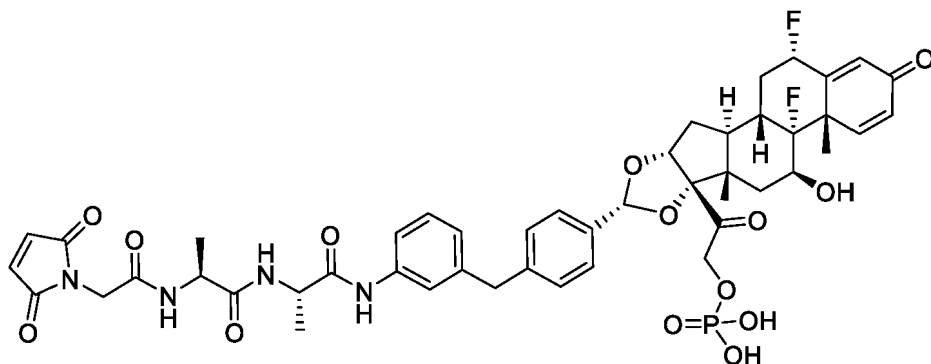
【0215】

[前駆体実施例 12] 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R

, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (2 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) アセトアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト[2', 1': 4, 5] インドノ[1, 2 - d][1, 3] ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩

【0216】

【化33】



10

【0217】

20

前駆体実施例1のアミノ生成物、前駆体実施例6(ステップ1)からのジペプチド、及び前駆体実施例9(ステップ4)からのマレイミド試薬を使用して、前駆体実施例12生成物を前駆体実施例9と類似の手順で合成した。LCMS(方法b、表7) $R_t = 0.82$ 分; $m/z = 965.2 [M+H]^+$ 。

1H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド- d_6) 9.74 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.26 7.19 (m, 3H), 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.74 5.51 (m, 2H), 5.50 (s, 1H), 4.96 4.83 (m, 2H), 4.56 (dd, $J = 18.2, 8.4$ Hz, 1H), 4.29 (dp, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 4.18 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.11 3.98 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 2.62 (dtd, $J = 33.1, 12.3, 4.2$ Hz, 1H), 2.34 2.14 (m, 2H), 2.03 (dt, $J = 13.3, 3.7$ Hz, 1H), 1.67 (dd, $J = 13.2, 5.1$ Hz, 3H), 1.46 (s, 4H), 1.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.85 (s, 3H).

30

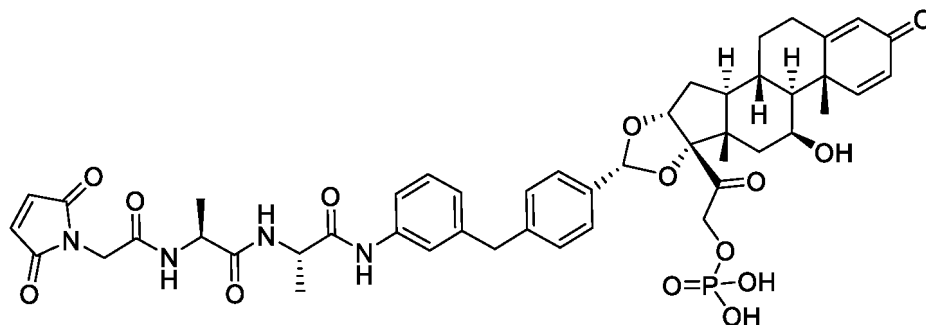
【0218】

[前駆体実施例13] 2 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (2 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) アセトアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト[2', 1': 4, 5] インドノ[1, 2 - d][1, 3] ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩

40

【0219】

【化 3 4】



10

【 0 2 2 0 】

前駆体実施例 2 のアミノ生成物、前駆体実施例 6 (ステップ 1) からのジペプチド、及び前駆体実施例 9 (ステップ 4) からのマレイミド試薬を使用して、前駆体実施例 13 生成物を前駆体実施例 9 と類似の手順で合成した。LCMS (方法 c、表 7) $R_t = 0.82$ 分; $m/z = 929.4 [M+H]^+$ 。

1H NMR (400MHz, ジメチルスルホキシド- d_6) = 9.79 (s, 1H), 8.42 (br d, $J=7.5$ Hz, 1H), 8.15 (br d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.49 - 7.28 (m, 5H), 7.25 - 7.12 (m, 3H), 7.07 (s, 2H), 6.90 (br d, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.16 (br d, $J=10.1$ Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.96 - 4.85 (m, 2H), 4.56 (dd, $J=8.3, 18.4$ Hz, 1H), 4.37 - 4.23 (m, 3H), 4.08 (br d, $J=2.6$ Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 2.19 - 1.95 (m, 3H), 1.84 - 1.60 (m, 6H), 1.38 (s, 3H), 1.27 (br d, $J=7.0$ Hz, 3H), 1.20 (br d, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.02 (br d, $J=11.4$ Hz, 2H), 0.87 (s, 3H), 0.00 - 0.00 (m, 1H).

20

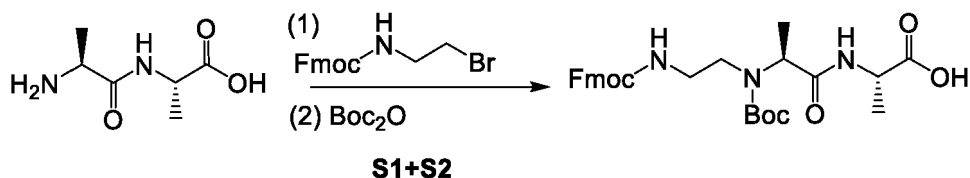
【 0 2 2 1 】

[前駆体実施例 14 A] (S)-2-((2-(2-プロモアセトアミド)エチル)アミノ)-N-((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミド

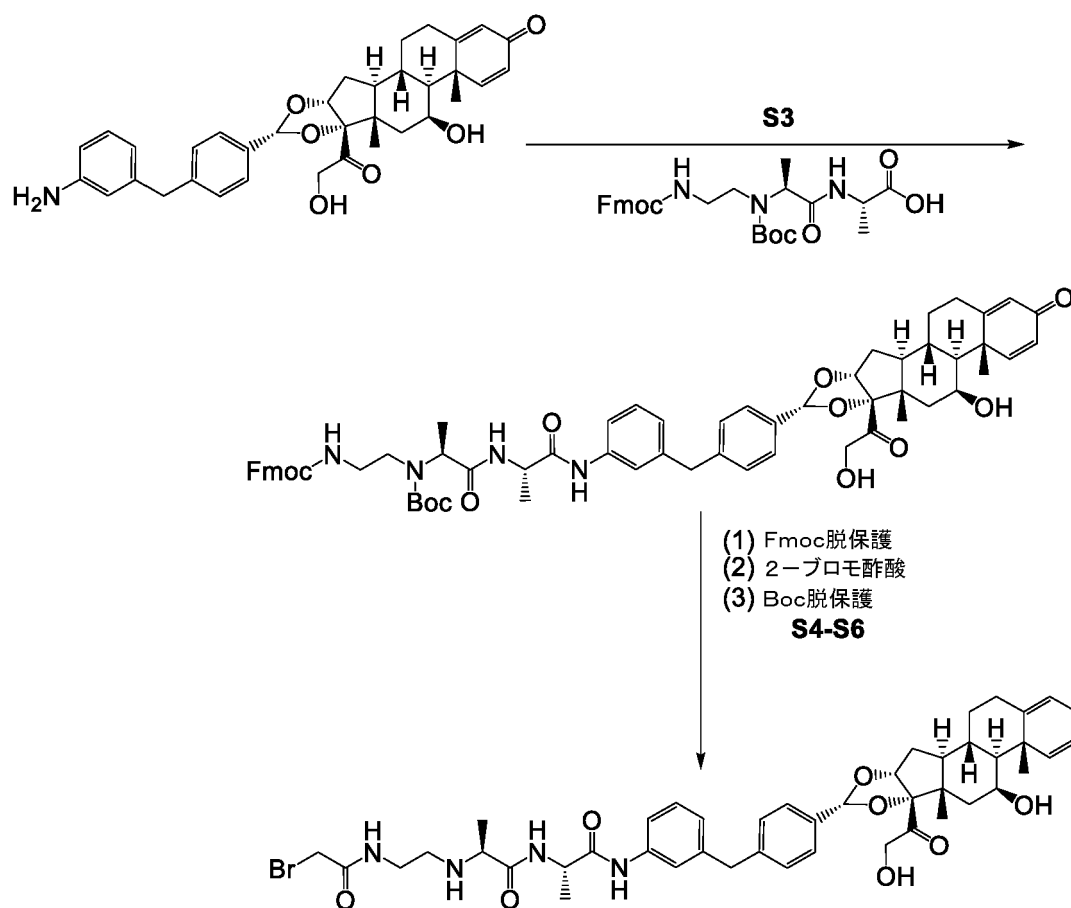
30

【 0 2 2 2 】

【化 3 5】



40



10

20

【0223】

前駆体実施例14A生成物は、N-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)エチル)-N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-アラニル-L-アラニン(ステップS1及びS2の生成物)の、実施例2のアミノ生成物へのカップリング、これに続くステップS4~S6:(1)Fmoc脱保護、(2)2-ブロモ酢酸とのカップリング、及び(3)Boc脱保護から合成することができる。Fmoc=フルオレニルメチルオキシカルボニル;Boc=tertブトキシカルボニル。

30

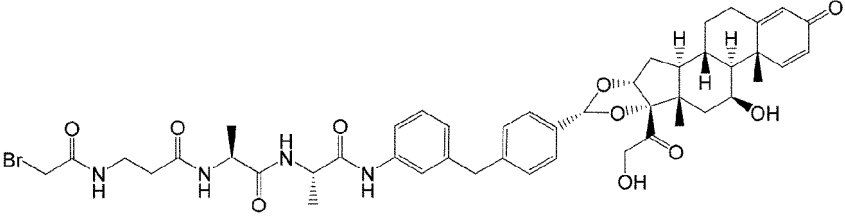
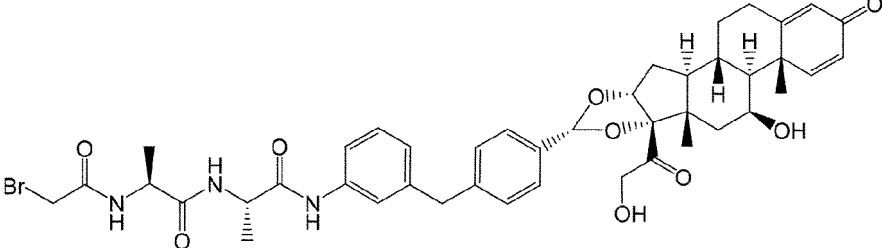
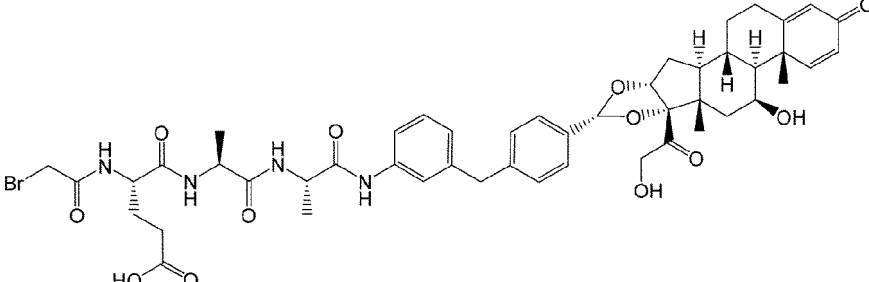
【0224】

追加の前駆体実施例

表10に列挙された実施例14B~48のプロモアセトアミド生成物は、本明細書に記載されている手順に従い合成することができる。

【0225】

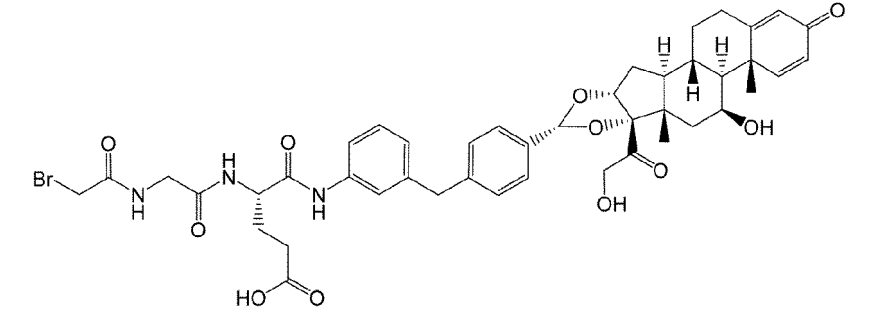
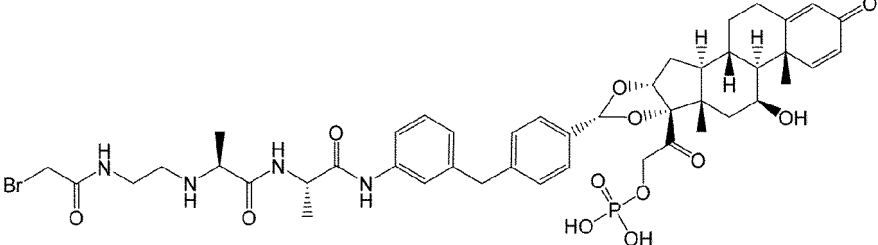
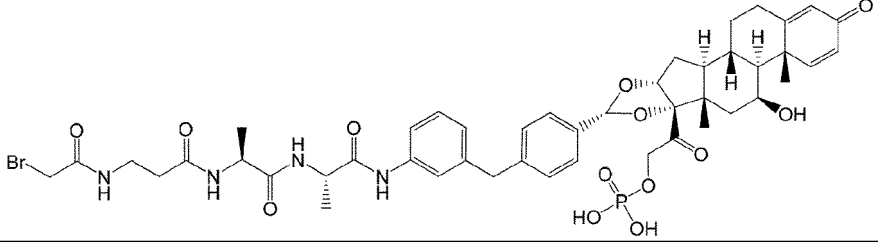
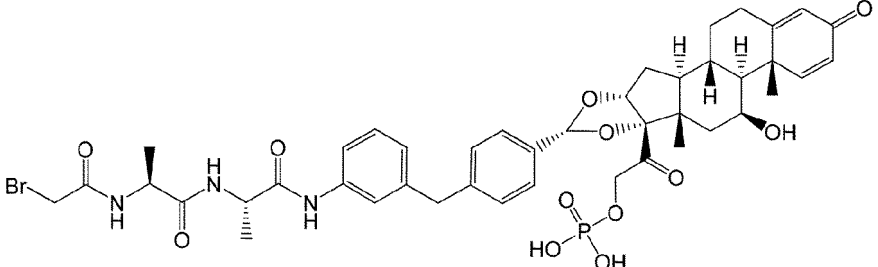
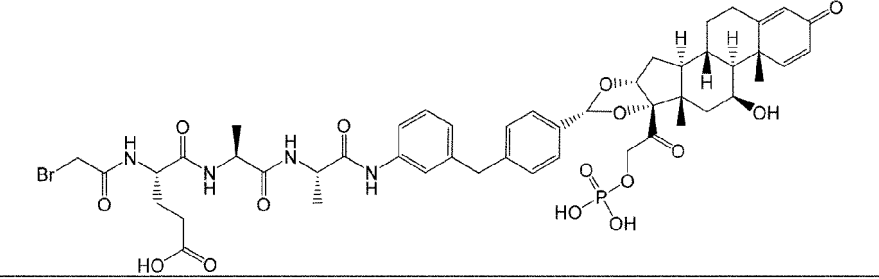
【表 9】

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
14 B		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 ステップ 5 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
15		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 ステップ 5 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
16		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>

10

20

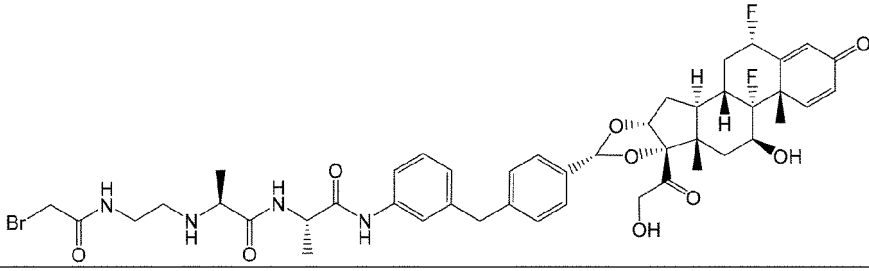
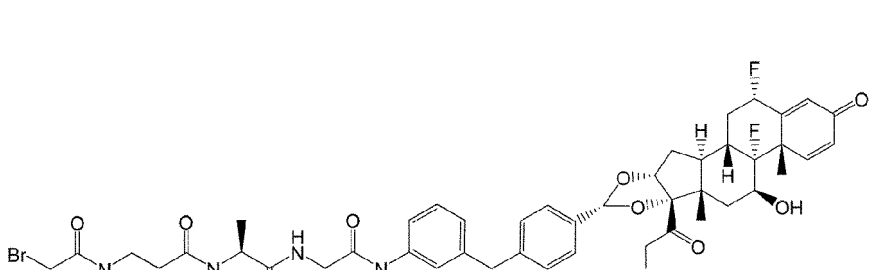
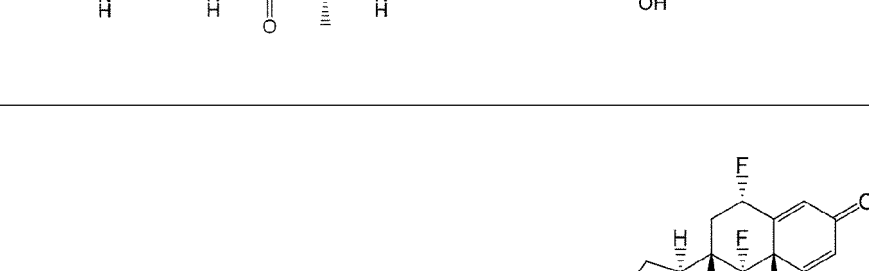
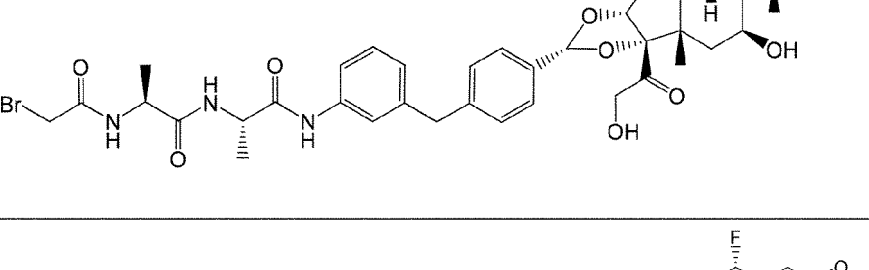
30

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
17		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>
18 A		<p>実施例 14A と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>
18 B		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>
19		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>
20		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>

10

20

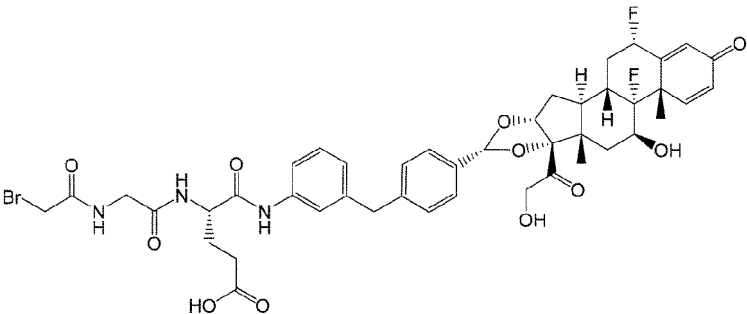
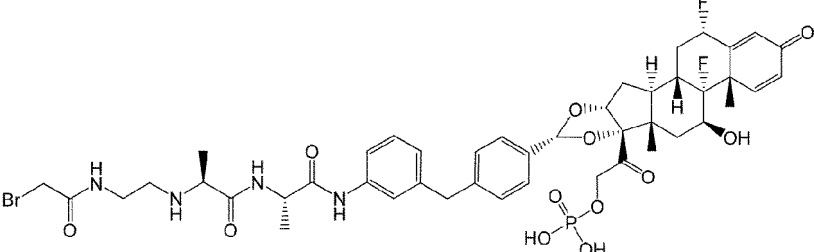
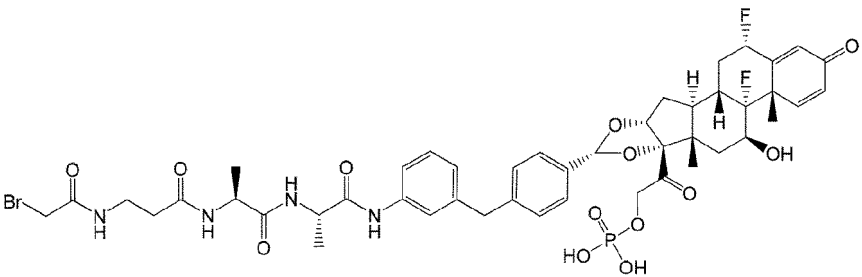
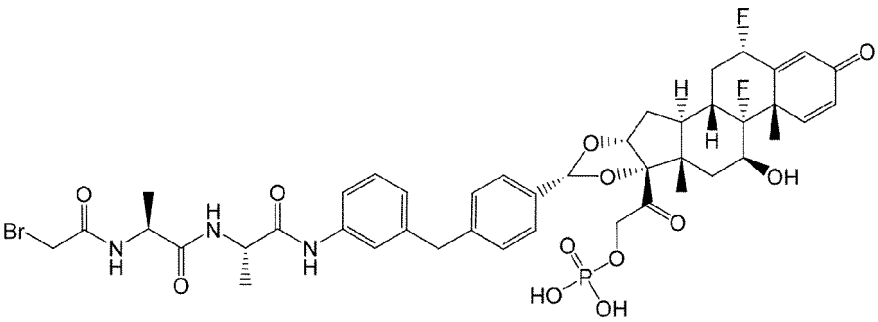
30

Ex	追加のプロモアセトアミド前駆体 プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
21 A		<p>実施例 14A と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p>
21 B		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 ステップ 5 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
22		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 ステップ 5 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
23		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>

10

20

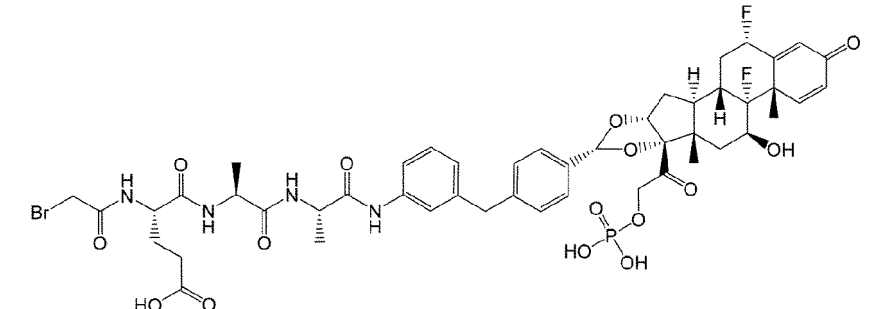
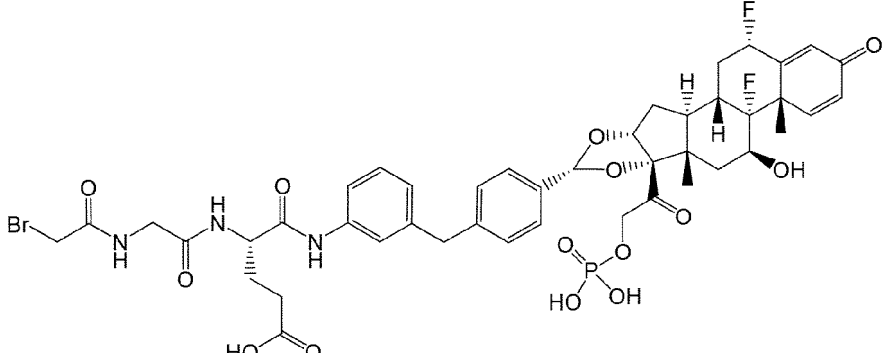
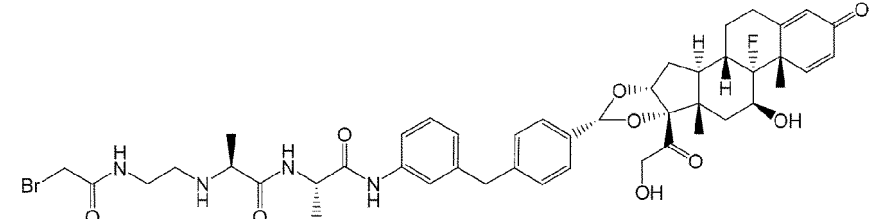
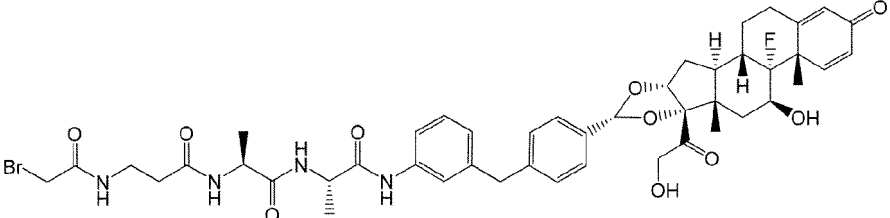
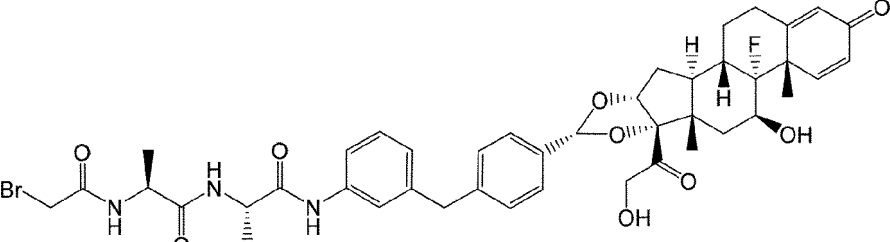
30

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
24		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
25 A		<p>実施例 14A と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p>
25 B		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
26		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>

10

20

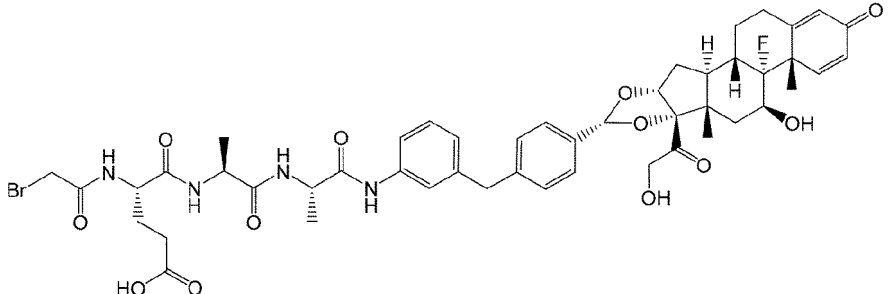
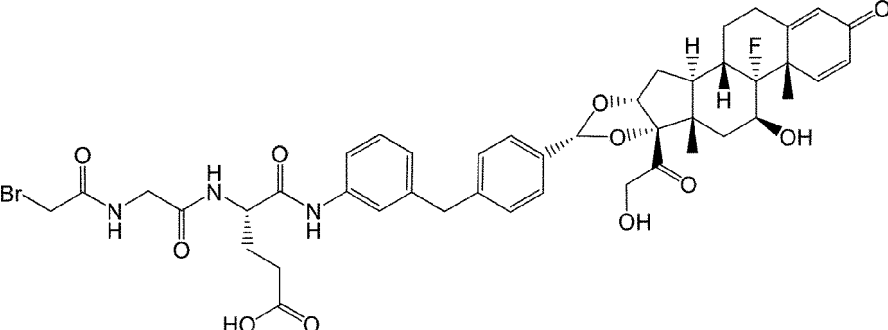
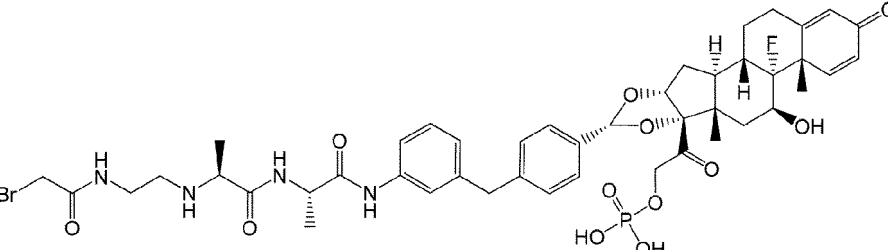
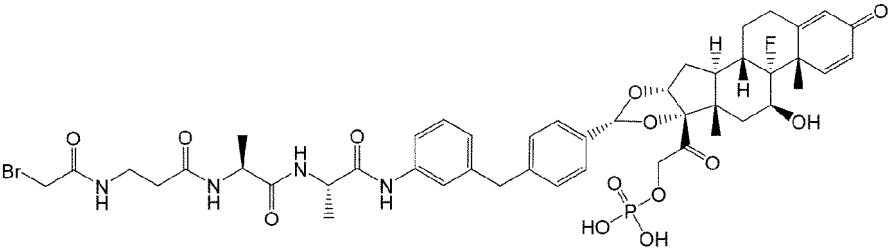
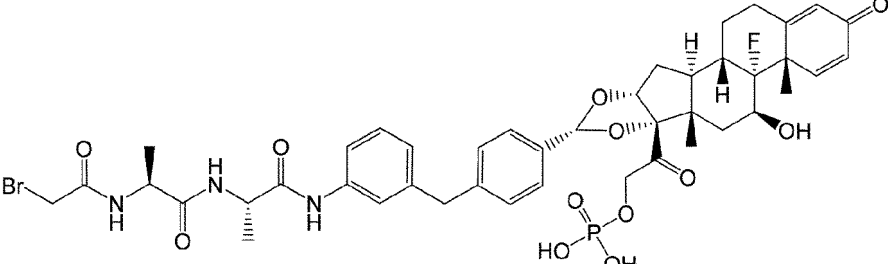
30

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
27		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
28		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 1 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
29 A		<p>実施例 14A と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
29 B		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 ステップ 5 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
30		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 ステップ 5 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>

10

20

30

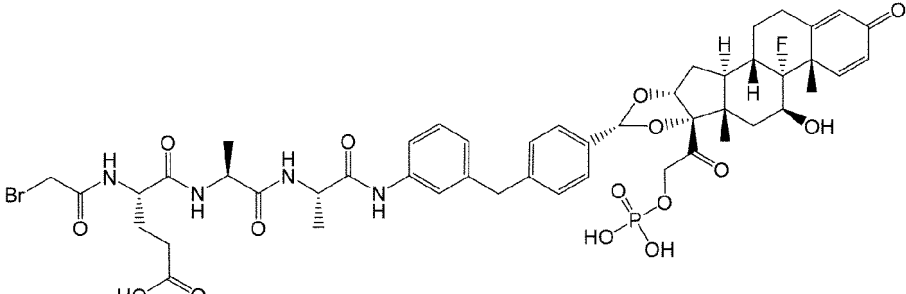
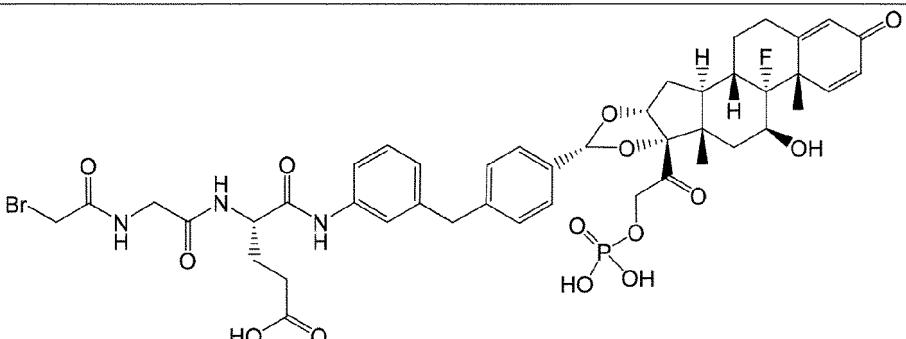
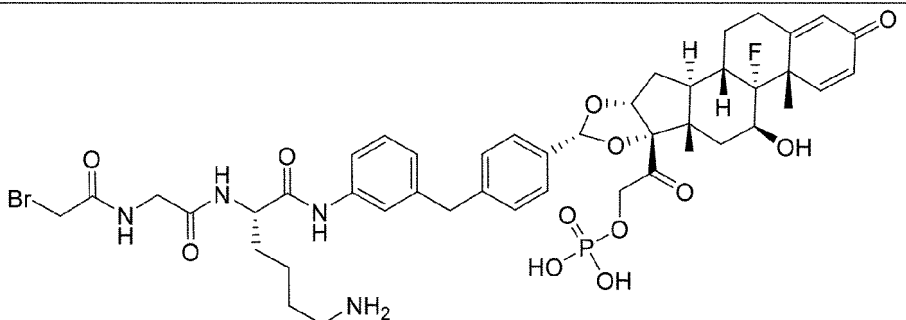
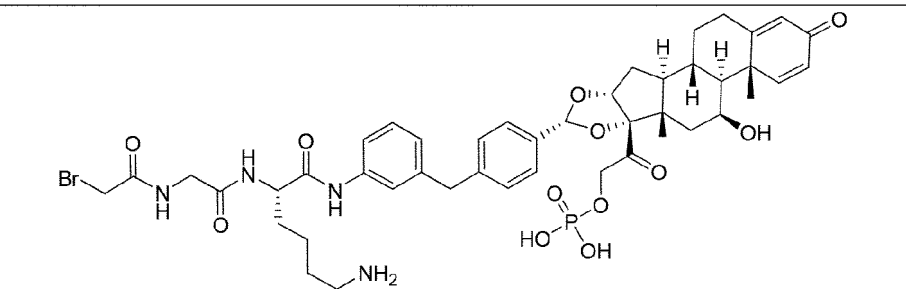
Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
31		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
32		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
33 A		<p>実施例 14A と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
33 B		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
34		<p>実施例 6 ステップ 1 及び 2 並びに実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>

10

20

30

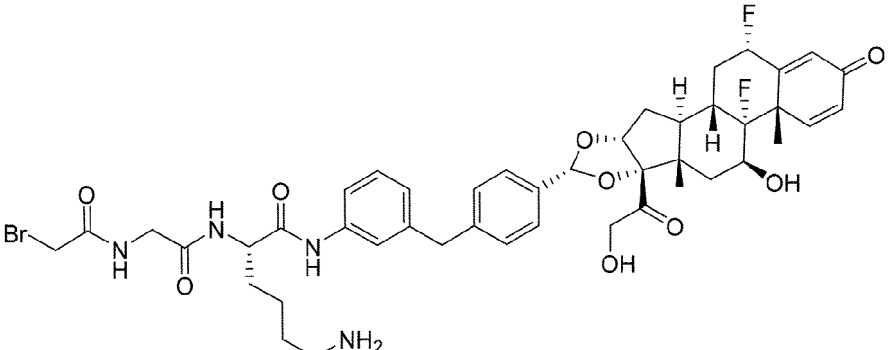
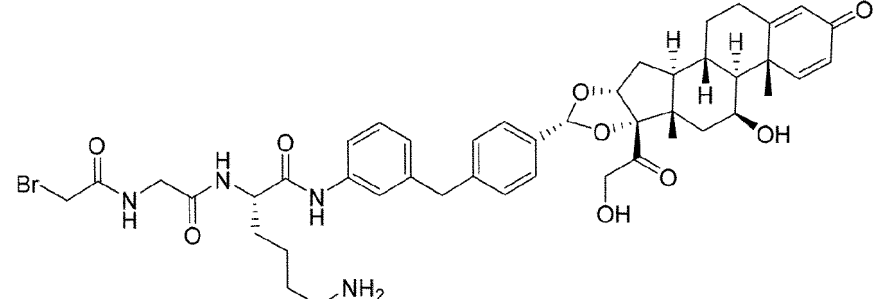
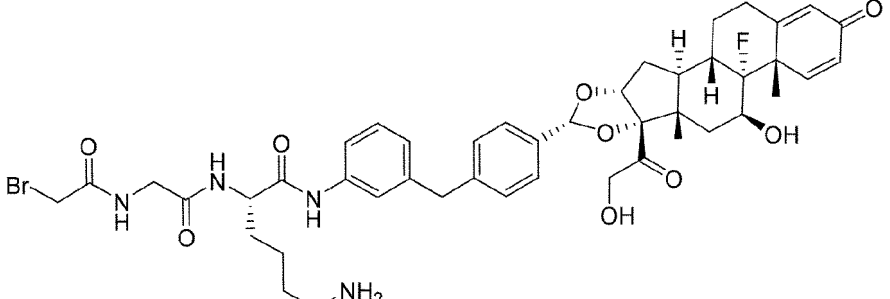
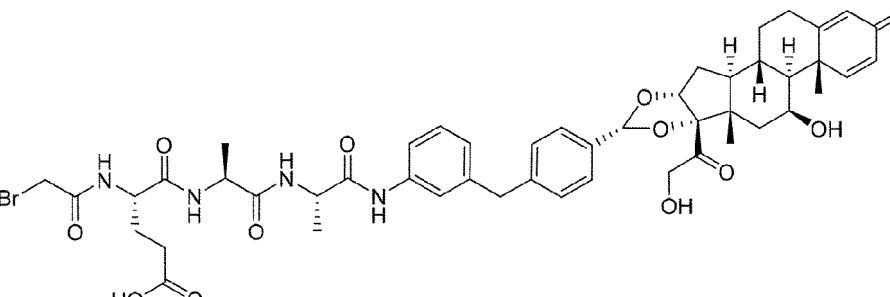
40

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
35		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
36		<p>実施例 4 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
37		<p>実施例 5 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
38		<p>実施例 5 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>

10

20

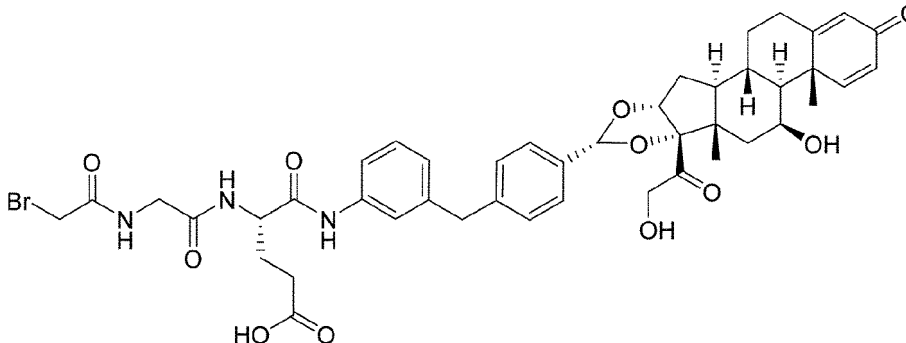
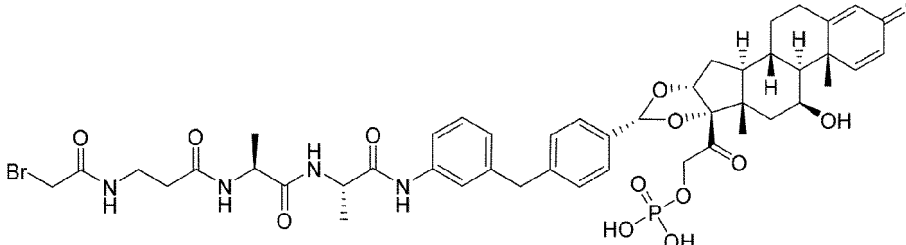
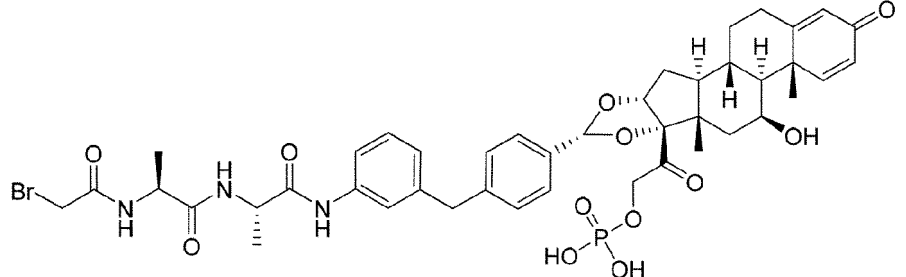
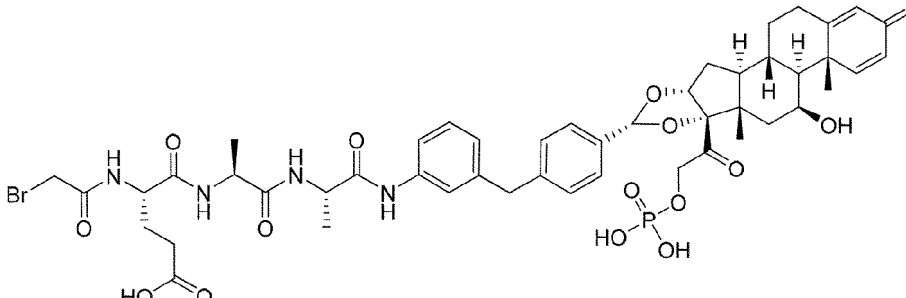
30

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
39		<p>実施例 5 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p> <p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
40		<p>実施例 5 と類似の経路を使用して、実施例 2 から作製することができる。</p>
41		<p>実施例 5 と類似の経路を使用して、実施例 3 から作製することができる。</p>
42		<p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>

10

20

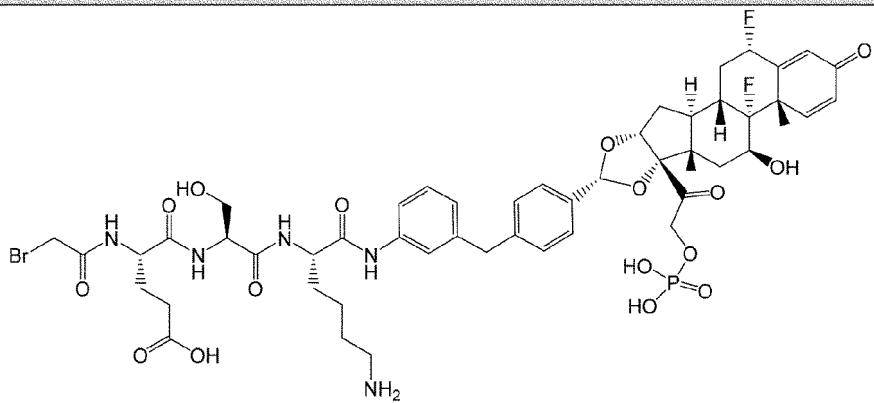
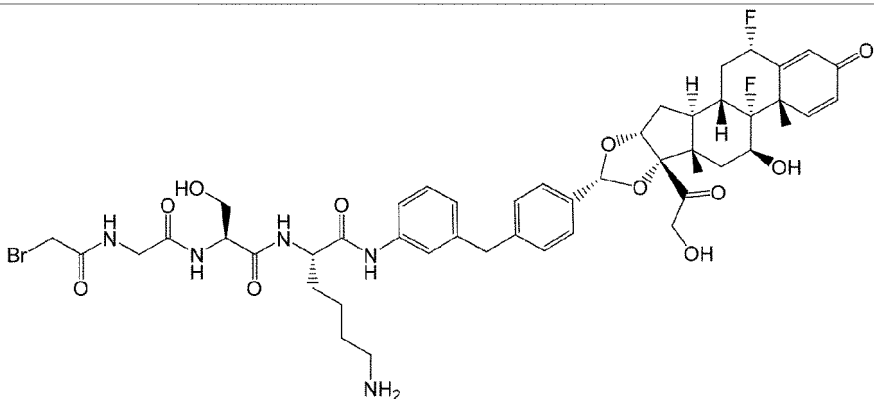
30

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
43		<p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
44		<p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
45		<p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>
46		<p>この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。</p>

10

20

30

Ex	プロモアセトアミド生成物	合成プロトコル
47		この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。
48		この前駆体に対する合成プロトコル及び特徴付けもまたこの表に続いて提供される。

10

20

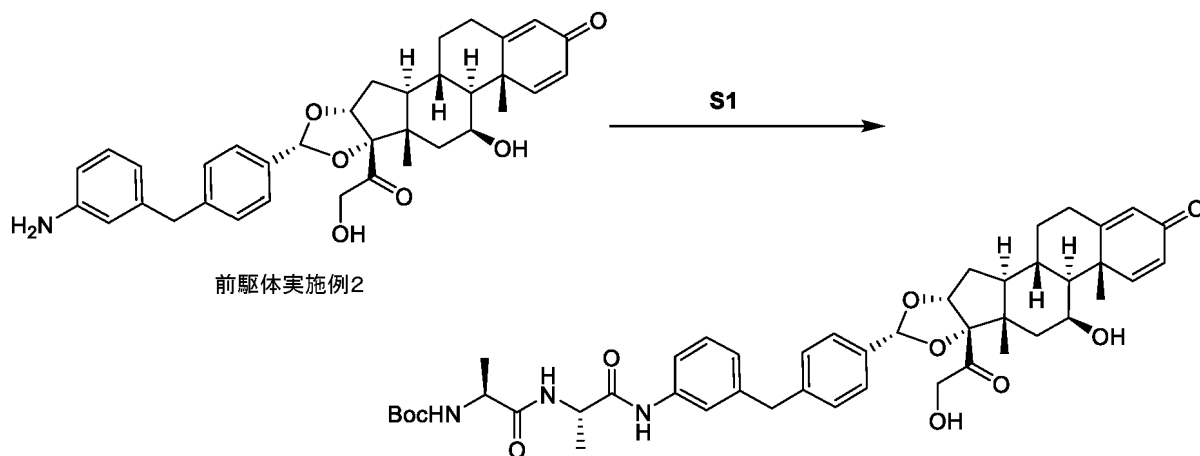
【0226】

[前駆体実施例14B] 3-(2-プロモアセトアミド)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミド

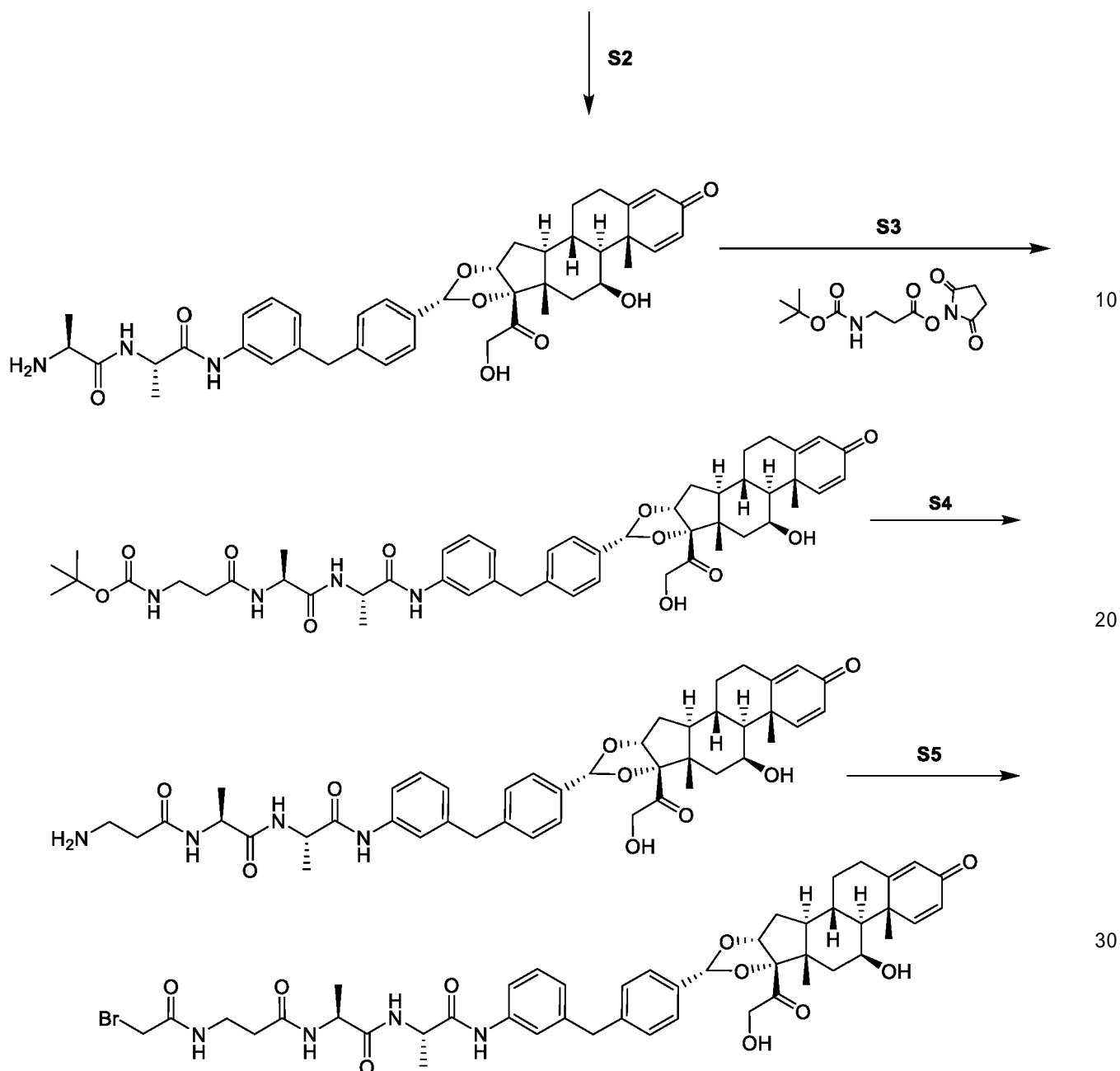
30

【0227】

【化36】



40



【 0 2 2 8 】

ステップ 1 : *tert*-ブチル((*S*)-1-((*S*)-1-((3-(4-(6*a**R*, 6*b**S*, 7*S*, 8*a**S*, 8*b**S*, 10*R*, 11*a**R*, 12*a**S*, 12*b**S*)-7-ヒドロキシ-8*b*-(2-ヒドロキシアセチル)-6*a*, 8*a*-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6*a*, 6*b*, 7, 8, 8*a*, 8*b*, 11*a*, 12, 12*a*, 12*b*-ドデカヒドロ-1*H*-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-*d*][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメートの合成。(*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-アラニル-*L*-アラニン(11.9 g、45.6 mmol、1.30 当量)のテトラヒドロフラン(140 mL)中溶液に、*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(11.3 g、45.6 mmol、1.30 当量)を加え、反応混合物を 15 で 0.5 時間攪拌した。次いで、前駆体実施例 2 ((6*a**R*, 6*b**S*, 7*S*, 8*a**S*, 8*b**S*, 10*R*, 11*a**R*, 12*a**S*, 12*b**S*)-10-(4-(3-アミノベンジル)フェニル)-7-ヒドロキシ-8*b*-(2-ヒドロキシアセチル)-6*a*, 8*a*-ジメチル-1, 2, 6*a*, 6*b*, 7, 8, 8*a*, 8*b*, 11*a*, 12, 12*a*, 12*b*-ドデカヒドロ-4*H*-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-

d][1,3]ジオキソール-4-オン(20.0g、35.1mmol)の生成物を加え、混合物を15で2時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して、残渣を得、シリカゲルでのカラムクロマトグラフィー(SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル=3/1~0/1)で精製して、表題化合物を生成した(25.0g、88%収率)。¹H NMR (400MHz ジメチルスルホキシド-d₆) 9.85 (s, 1H), 7.96 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.37-7.41 (m, 4H), 7.31 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 7.21-7.23 (m, 3H), 6.94 (dd, J = 23.6, 7.2 Hz, 2H), 6.16 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.08 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.50 (dd, J = 19.6, 6.4 Hz, 1H), 4.35-4.38 (m, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.18 (dd, J = 19.6, 5.6 Hz, 1H), 3.98-4.16 (m, 1H), 3.89 (s, 2H), 2.54-2.58 (m, 1H), 2.31 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 2.03 - 2.10 (m, 2H), 1.67 - 1.77 (m, 6H), 1.39 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.16-1.19 (m, 3H), 1.01-1.03 (m, 2H), 0.86 (s, 3H).

10

20

30

40

【0229】

ステップ2: (S)-2-アミノ-N-((S)-1-((3-(4-(6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミド塩酸塩の合成。tert-ブチル((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメート(15.0g、18.5mmol、1.0当量)のHCl/メチルtert-ブチルエーテル(90mL、4M)中溶液を20で0.5時間撹拌した。反応混合物を濾過し、フィルターケーキを乾燥させた。残渣を分取HPLCにより精製して、表題化合物を生成した(10.2g、74%収率)。¹H NMR (400 MHz ジメチルスルホキシド-d₆) 10.0 (s, 1H), 8.68 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.13 (br d, J = 3.6 Hz, 3H), 7.43 - 7.45 (m, 2H), 7.39 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 7.21 - 7.24 (m, 3H), 6.93 (br d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.16 (dd, J = 10.0, 1.6 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.92 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.82 (br s, 1H), 4.41 - 4.52 (m, 2H), 4.29 (br s, 1H), 4.18 (d, J = 19.6 Hz, 1H), 3.87 - 3.89 (m, 3H), 2.54 - 2.58 (m, 1H), 2.29 - 2.33 (m, 1H), 2.01 - 2.03 (m, 2H), 1.67 - 1.77 (m, 5H), 1.40 (s, 3H), 1.34 (dd, J = 14.4, 6.8 Hz, 6H), 1.02 - 1.03 (m, 2H), 0.86 (s, 3H).

【0230】

ステップ3: tert-ブチル(3-((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-オキソプロピル)カルバメートの合成。2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3-((tert-ブトキシカル

50

ボニル)アミノ)プロパノエート(205mg、0.716mmol)のジメチルホルムアミド(3mL)中溶液に、(S)-2-アミノ-N-((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミド(333mg、0.477mmol)及びN、N-ジイソプロピルエチルアミン(0.167mL、0.954mmol)を25 で加えた。反応物を25 で2時間撹拌した。2つの追加のバイアルを上に記載されているように設定した。すべての3種の反応混合物を合わせ、分取HPLC(方法AA1)で精製して、表題化合物を生成した(300mg、24%収率)。LCMS(方法AA13)Rt = 1.152分、m/z 883.5 (M+H)⁺。

【0231】

ステップ4: 3-アミノ-N-((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミドの合成。tert-ブチル(3-((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメート(100mg、0.113mmol)のジクロロメタン(1mL)中溶液に、トリフルオロ酢酸(0.33mL、4.28mmol)を25 で加えた。反応物を25 で1時間撹拌した。1つの追加のバイアルを上に記載されているように設定した。両方の反応混合物を合わせ、分取HPLC(方法AA2)で精製して、表題化合物を生成した(50mg、28%収率)。LCMS(方法AA13)Rt = 0.987分、m/z 783.4 (M+H)⁺。

【0232】

ステップ5: 3-(2-プロモアセトアミド)-N-((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミドの合成。2-プロモ酢酸(35.5mg、0.255mmol)のジメチルホルムアミド(1mL)中溶液に、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1, 2-ジヒドロキノリン(63.2mg、0.255mmol)を25 で加えた。反応物を25 で30分間撹拌し、次いで3-アミノ-N-((S)-1-((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-

10

20

30

40

50

オキシプロパン - 2 - イル) プロパンアミド (1 0 0 m g 、 0 . 1 2 8 m m o l) を 2 5
で加えた。反応物を 2 5 で 2 時間攪拌した。1つの追加のバイアルを上に記載されて
いるように設定した。両方の反応混合物を合わせ、分取 H P L C (方法 A A 3) で精製し
て、表題化合物を生成した (8 0 m g 、 3 5 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 4) R t : 2
. 9 9 3 分。 m/z 9 0 5 . 3 ($M + H$) $^{+}$ 。 1H NMR (メタノール- d_4 , 400MHz)

7.53 - 7.48 (m, 1H), 7.46 - 7.40 (m, 2H), 7.34 (dd, $J=1.5$, 8.2 Hz, 2H), 7.23 - 7.14 (m, 3H), 6.92 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J=9.5$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.42 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J=19.4$ Hz, 1H), 4.48 - 4.21 (m, 4H), 3.93 (d, $J=2.2$ Hz, 2H), 3.76 (s, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.45 (五重線の二重線, $J=6.4$, 12.8 Hz, 2H), 2.65 (dt, $J=5.6$, 13.1 Hz, 1H), 2.52 - 2.34 (m, 3H), 2.25 (dq, $J=3.9$, 10.8 Hz, 1H), 2.13 (br dd, $J=5.7$, 12.6 Hz, 1H), 1.95 (br d, $J=13.7$ Hz, 1H), 1.89 - 1.64 (m, 5H), 1.48 (s, 3H), 1.43 (dd, $J=2.2$, 7.3 Hz, 3H), 1.36 (dd, $J=7.2$, 10.7 Hz, 3H), 1.20 - 1.07 (m, 1H), 1.03 (ddd, $J=3.6$, 7.5, 11.1 Hz, 1H), 0.98 (s, 3H).

10

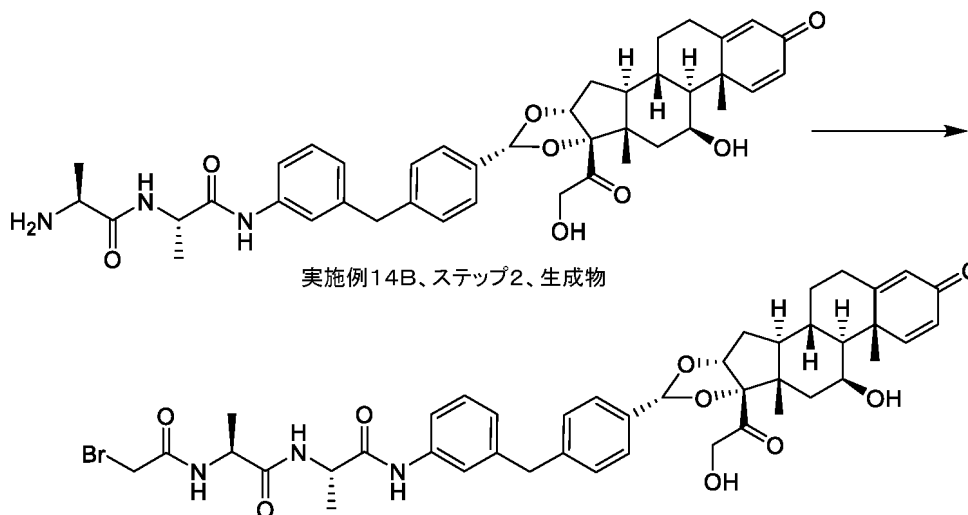
【 0 2 3 3 】

[前駆体実施例 1 5] (S) - 2 - (2 - プロモアセトアミド) - N - ((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキシプロパン - 2 - イル) プロパンアミド

20

【 0 2 3 4 】

【 化 3 7 】



30

【 0 2 3 5 】

ステップ 1 : (S) - 2 - (2 - プロモアセトアミド) - N - ((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキシプロパン - 2 - イル) プロパンアミドの合成。2 - プロモ酢酸 (1 0 9 m g 、 0 . 7 8 7 m m o l) のジメチルホルムアミド (2 m L) 中溶液に、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1、2 - ジヒドロキノリン (1 9 5 m g 、 0 . 7 8 7 m m o l) を 2 5 で加えた。反応物を 2 5 で 3 0 分間攪拌し、この時点で、前駆体実施例 1 4 B、ステップ 2 の生成物 ((

40

50

(S) - 2 - アミノ - N - ((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) プロパンアミド) (280 mg , 0.393 mmol) を混合物に加えた。反応物を 25 で 2 時間攪拌し、次いで分取 HPLC (方法 A A 5) で精製して、表題化合物を生成した (85 mg、26% 収率)。LCMS (方法 A A 4) Rt = 3.10 分、m/z 834.3 (M + H)⁺。¹H NMR (メタノール-d₄, 400 MHz) 0.98 (s, 3H), 1.02 (br s, 1H), 1.12 (br d, J=10.5 Hz, 1H), 1.40 (br dd, J=7.0, 10.5 Hz, 6H), 1.48 (s, 3H), 1.89 - 1.66 (m, 4H), 1.98 - 1.89 (m, 1H), 2.12 (br d, J=12.7 Hz, 1H), 2.24 (br d, J=10.5 Hz, 1H), 2.37 (br d, J=11.0 Hz, 1H), 2.70 - 2.58 (m, 1H), 3.93 - 3.80 (m, 4H), 4.46 - 4.24 (m, 4H), 4.61 (d, J=19.3 Hz, 1H), 5.04 (d, J=4.8 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 6.24 (br d, J=8.8 Hz, 1H), 6.90 (br d, J=7.0 Hz, 1H), 7.23 - 7.12 (m, 3H), 7.47 - 7.30 (m, 5H).

10

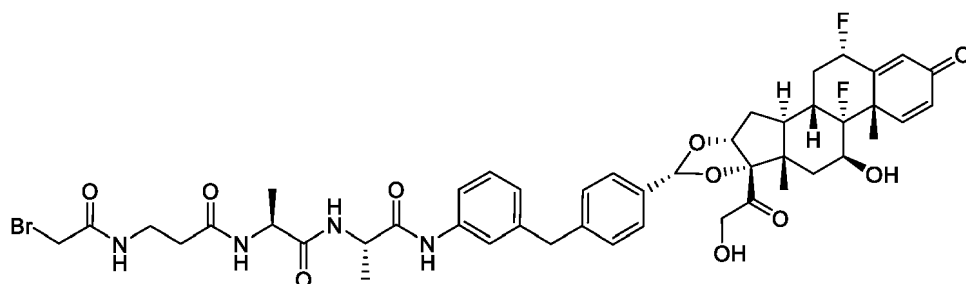
【0236】

[前駆体実施例 21B] (S) - 2 - ((2 - (2 - プロモアセトアミド) エチル) アミノ) - N - ((S) - 1 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) プロパンアミド

20

【0237】

【化38】



30

【0238】

(2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 1 , 2 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 4 - オンを使用して、前駆体実施例 14B と類似の経路を使用して調製した。

40

LCMS (方法 A A 4) Rt = 2.942 分、m/z 940.3 (M + H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆) = 9.81 - 9.68 (m, 1H), 8.31 - 8.17 (m, 2H), 8.15 - 8.04 (m, 1H), 7.56 - 7.39 (m, 2H), 7.35 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.30 - 7.16 (m, 4H), 6.91 (d, J=7.5 Hz, 1H), 6.30 (dd, J=2.0, 10.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.74 - 5.49 (m, 2H), 5.45 (s, 1H), 5.46 - 5.43 (m, 1H), 4.94 (d, J=4.8 Hz, 1H), 4.51 (d, J=19.7 Hz,

50

1H), 4.40 - 4.15 (m, 4H), 3.88 (s, 2H), 3.82 (d, J=3.9 Hz, 2H), 3.32 - 3.22 (m, 2H), 2.72 - 2.57 (m, 1H), 2.36 - 2.19 (m, 4H), 2.09 - 2.00 (m, 1H), 1.78 - 1.62 (m, 3H), 1.57 - 1.45 (m, 4H), 1.27 (dd, J=2.4, 7.2 Hz, 3H), 1.20 (d, J=7.0 Hz, 3H), 0.86 (s, 3H).

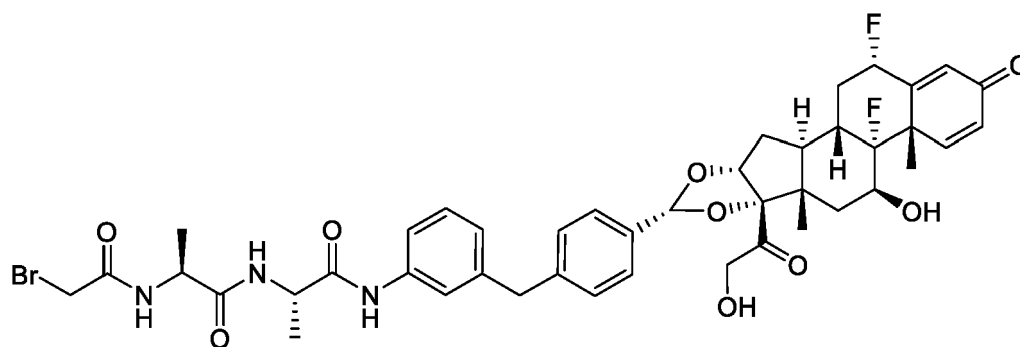
【0239】

[前駆体実施例22] (S)-2-(2-プロモアセトアミド)-N-((S)-1-((3-(4-(2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)プロパンアミド

10

【0240】

【化39】



20

【0241】

(2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-((4-(3-アミノベンジル)フェニル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-4H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-4-オンを使用して、前駆体実施例15と類似の経路を使用して調製した。

30

LCMS (方法A4) Rt = 3.089分、m/z 869.3 (M+H)⁺. ¹H NMR (メタノール-d₄) 7.29-7.57 (m, 5H), 7.15-7.26 (m, 3H), 6.93 (br d, J=7.02 Hz, 1H), 6.30-6.38 (m, 2H), 5.47-5.68 (m, 1H), 5.43-5.45 (m, 1H), 5.04 (br d, J=3.95 Hz, 1H), 4.62 (br d, J=19.29 Hz, 1H), 4.25-4.46 (m, 4H), 3.93 (br s, 2H), 3.77-3.90 (m, 2H), 2.60-2.78 (m, 1H), 2.21-2.49 (m, 3H), 1.63-1.85 (m, 4H), 1.58 (s, 3H), 1.35-1.46 (m, 6H), 0.98 (s, 3H).

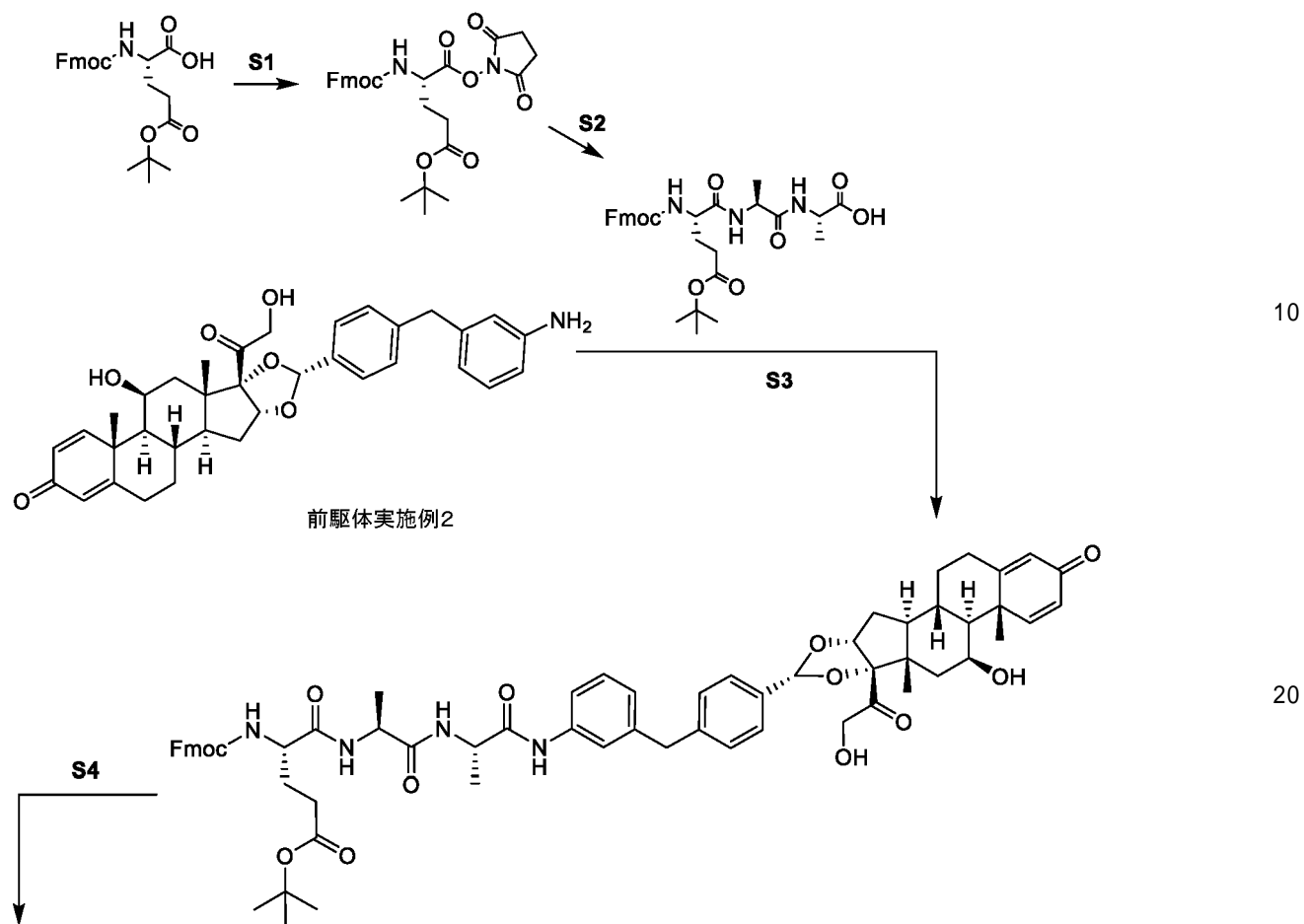
【0242】

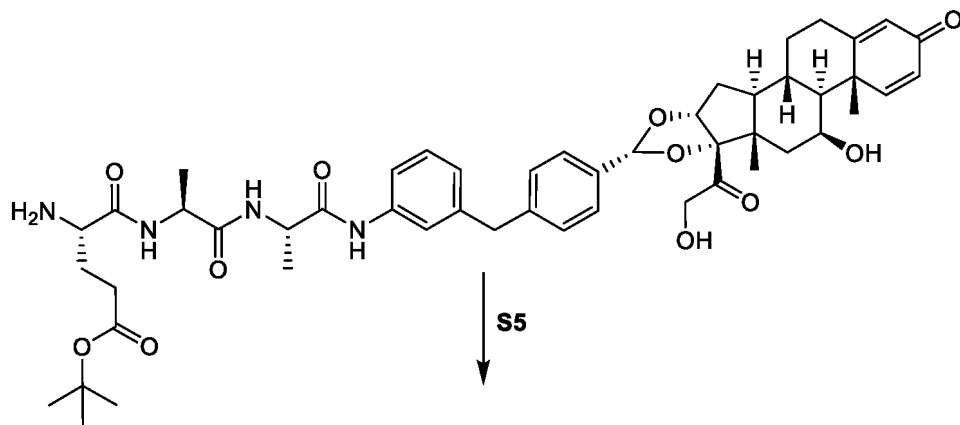
[前駆体実施例42] (S)-4-(2-プロモアセトアミド)-5-(((S)-1-((S)-1-((3-(4-(6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-5-オキソペンタン酸

40

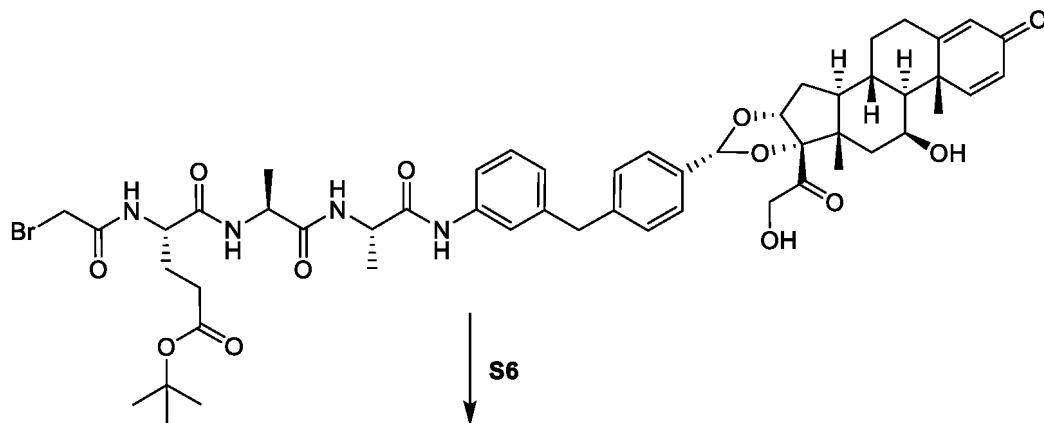
【0243】

【化 4 0】

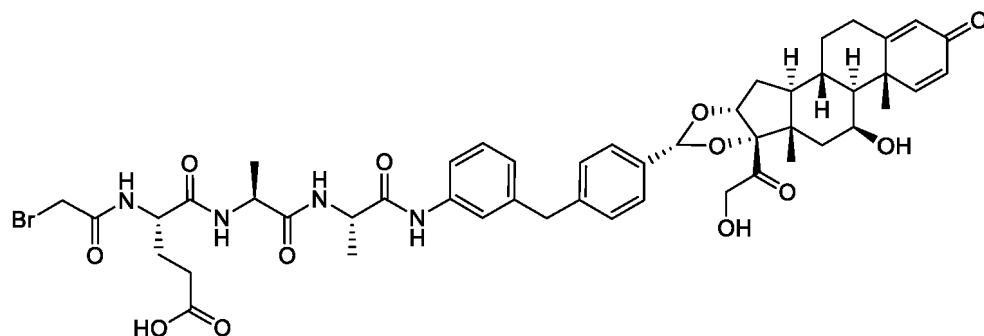




10



20



30

【 0 2 4 4 】

ステップ 1 : 5 - (tert - ブチル) 1 - (2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) - L - グルタメートの合成。 (S) - 2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (tert - ブトキシ) - 5 - オキソペンタン酸 (50 g、118 mmol) 及び 1 - ヒドロキシピロリジン - 2 , 5 - ジオン (13.52 g、118 mmol) のジクロロメタン (600 mL) 中溶液に、 N , N ' - メタンジイリデンジシクロヘキサンアミン (DCC) (24.25 mg、118 mmol) を 0 で加え、混合物を 25 で 4 時間撹拌した。混合物を、焼結ガラス漏斗を介して濾過し、ジクロロメタン (100 mL) で洗浄した。溶媒を真空下で除去して、表題化合物を生成した (60 g、96% 収率)。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1.663 分、 m / z 545.0 (M + N a) ⁺。 ¹H N M R (C D C l ₃, 400 MHz) 1.40 - 1.54 (m, 9 H) 2.15 (dq, J=14.53, 7.36 Hz, 1 H) 2.25 - 2.38 (m, 1 H) 2.39 - 2.53 (m, 2 H) 2.82 (s, 4 H) 4.17 - 4.27 (m, 1 H) 4.30 - 4.49 (m, 2 H) 4.72 - 4.83 (m, 1 H) 5.71 (br d, J=8.16 Hz, 1 H) 7.24 - 7.34 (m, 2 H) 7.36 - 7.44 (m, 2 H) 7.55 - 7.63 (m, 2 H) 7.76 (d, J=7.50 Hz, 2 H). F m o c = フルオレニルメチルオキシカルボニル

40

【 0 2 4 5 】

50

ステップ2: ((S) - 2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキソペンタノイル) - L - アラニル - L - アラニンの合成。(S) - 2 - ((S) - 2 - アミノプロパンアミド) プロパン酸 (6 . 1 3 g 、 3 8 . 3 m m o l) の 1 , 2 - ジメトキシエタン (2 0 0 m L) 及び水 (1 3 3 m L) 中溶液に、NaHCO₃ (1 2 . 8 6 g 、 1 5 3 m m o l) 及び 5 - (t e r t - ブチル) 1 - (2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) - L - グルタメート (2 0 g 、 3 8 . 3 m m o l) を加えた。混合物を 2 5 で 4 時間撹拌した。混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。NaHCO₃ 飽和溶液 (2 5 0 m L) 及び酢酸エチル (2 5 0 m L) を加え、層を分離した。水性 HCl (1 M 、 2 5 0 m L) を水層に加え、酢酸エチル (3 0 0 m L) で抽出した。有機層を脱水し (Na₂SO₄) 、濾過し、溶媒を真空下で除去して、表題化合物を生成した (1 5 g 、 6 9 % 収率) 。LCMS (方法 A A 1 3) R_t = 1 . 1 7 0 分、m/z 5 6 8 . 4 (M + H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz)

1.15 (t, J=7.06 Hz, 1 H) 1.21 (br d, J=7.06 Hz, 3 H) 1.26 (br d, J=7.28 Hz, 3 H) 1.37 (s, 9 H) 1.65 - 1.78 (m, 1 H) 1.81 - 1.93 (m, 1 H) 1.96 (s, 1 H) 2.23 (br t, J=7.83 Hz, 2 H) 4.01 (五重線, J=7.11 Hz, 2 H) 4.15 - 4.23 (m, 2 H) 4.23 - 4.32 (m, 2 H) 7.26 - 7.34 (m, 2 H) 7.36 - 7.43 (m, 2 H) 7.53 (br d, J=8.16 Hz, 1 H) 7.71 (br t, J=6.73 Hz, 2 H) 7.86 (d, J=7.50 Hz, 2 H) 7.99 (br d, J=7.28 Hz, 1 H) 8.14 (br d, J=7.28 Hz, 1 H) 12.53 (br s, 1 H) .

【 0 2 4 6 】

ステップ3: t e r t - ブチル (S) - 4 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。((S) - 2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキソペンタノイル) - L - アラニル - L - アラニン (1 . 4 9 5 g 、 2 . 6 3 m m o l) のジメチルホルムアミド (5 m L) 中溶液に、2 , 4 , 6 - トリプロピル - 1 , 3 , 5 , 2 , 4 , 6 - トリオキサトリホスフィン 2 , 4 , 6 - トリオキシド (2 . 2 3 4 g 、 3 . 5 1 m m o l) 及びトリエチルアミン (0 . 5 3 3 g 、 5 . 2 7 m m o l) を 0 で加えた。混合物を 2 5 で 3 0 分間撹拌した。前駆体実施例 2 ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 1 , 2 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 4 - オン) (1 g 、 1 . 7 5 5 m m o l) を混合物に 2 5 で加え、反応物を 1 2 時間撹拌した。混合物を氷冷水 (5 0 m L) に加え、沈殿物を濾過によって収集して、表題化合物を生成した (1 . 6 8 g 、 8 6 % 収率) 。LCMS (方法 A A 1 3) R_t = 1 . 3 4 4 分、m/z 1 1 1 9 . 5 (M + H)⁺。

【 0 2 4 7 】

ステップ4: t e r t - ブチル (S) - 4 - アミノ - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 ,

1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。tert - ブチル (S) - 4 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (1 . 6 8 g 、 1 . 5 0 1 m m o l) のアセトニトリル (3 m L) 中溶液に、ピペリジン (0 . 6 m L 、 1 . 5 0 1 m m o l) を 0 で加えた。混合物を 0 で 1 0 分間撹拌した。トリフルオロ酢酸 (0 . 5 m L) を加え、混合物を分取 H P L C (方法 A A 6) で精製して、表題化合物を生成した (1 . 0 3 g 、 7 6 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 0 8 0 分、m / z 8 9 7 . 5 (M + H) ⁺。

【 0 2 4 8 】

ステップ 5 : tert - ブチル (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。tert - ブチル (S) - 4 - アミノ - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (1 6 0 m g 、 0 . 1 7 8 m m o l) のジメチルホルムアミド (3 m L) 中溶液に、2 - プロモ酢酸 (3 7 . 2 m g 、 0 . 2 6 8 m m o l) 及びエチル 2 - エトキシキノリン - 1 (2 H) - カルボキシレート (5 2 . 9 m g 、 0 . 2 1 4 m m o l) を加えた。混合物を 2 5 で 2 時間撹拌した。反応物を酢酸エチル (5 0 m L) で希釈し、水性 H B r (1 M 、 2 × 4 0 m L) 、飽和水性 N a H C O ₃ (3 0 m L) 及びブライン (3 0 m L) で洗浄した。有機層を脱水し (N a ₂ S O ₄) 、濾過し、濃縮して表題化合物を生成した (1 4 0 m g 、 7 7 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 2 3 2 分、m / z 1 0 1 9 . 4 (M + H) ⁺。

【 0 2 4 9 】

ステップ 6 : (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸の合成。tert - ブチル (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 -

10

20

30

40

50

ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (1 4 0 m g 、 0 . 1 3 8 m m o l) のジクロロメタン (3 m L) 中溶液に、トリフルオロ酢酸 (1 m L) を加えた。混合物を 2 0 で 1 時間攪拌した。溶媒を真空下で除去し、粗生成物を分取 H P L C (方法 A A 5) で精製して、表題化合物を生成した (3 6 m g 、 2 6 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 4) R t = 2 . 9 7 5 分、 m / z 9 6 1 . 9 (M + H) ⁺。 ¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) . 0.84 (s, 3 H) 0.95 - 1.13 (m, 2 H) 1.18 - 1.28 (m, 6 H) 1.38 (s, 3 H) 1.56 - 1.82 (m, 6 H) 1.83 - 1.95 (m, 1 H) 2.00 (br d, J=12.13 Hz, 1 H) 2.06 - 2.16 (m, 1 H) 2.18 - 2.34 (m, 4 H) 2.52 - 2.72 (m, 1 H) 3.82 - 3.94 (m, 4 H) 4.09 - 4.39 (m, 5 H) 4.48 (d, J=19.40 Hz, 1 H) 4.78 (br s, 1 H) 4.90 (d, J=5.07 Hz, 1 H) 5.38 (s, 1 H) 5.92 (s, 1 H) 6.15 (dd, J=10.03, 1.65 Hz, 1 H) 6.89 (d, J=7.72 Hz, 1 H) 7.15 - 7.24 (m, 3 H) 7.30 (d, J=9.92 Hz, 1 H) 7.37 (d, J=7.94 Hz, 2 H) 7.39 - 7.49 (m, 2 H) 8.00 - 8.31 (m, 2 H) 8.47 (dd, J=7.50, 4.19 Hz, 1 H) 9.62 - 9.90 (m, 1 H) .

10

【 0 2 5 0 】

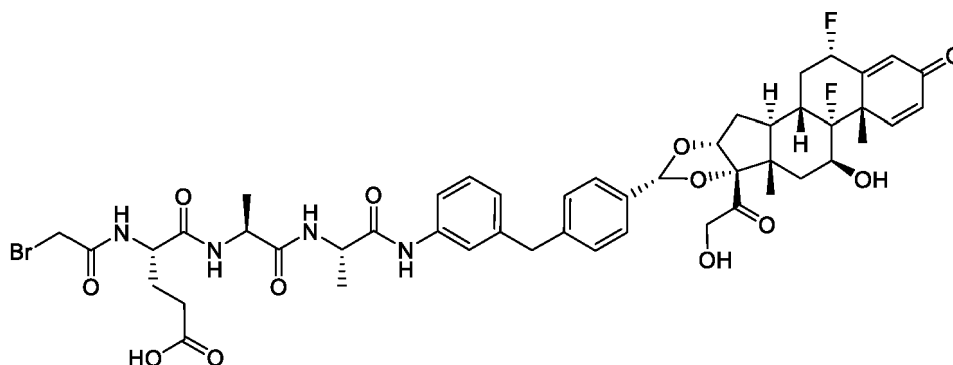
20

[前駆体実施例 2 3] (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸

【 0 2 5 1 】

30

【 化 4 1 】



40

(2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 1 , 2 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 4 - オンを使用して、前駆体実施例 4 2 と類似の経路を使用して調製した。

【 0 2 5 2 】

L C M S (方法 A A 4) R t = 2 . 6 6 8 分、 m / z 9 9 9 . 3 (M + H) ⁺。 ¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆) = 12.12 (br s, 1H), 9.89 - 9.72 (m, 1

50

H), 8.50 - 8.45 (m, 1H), 8.40 - 8.24 (m, 1H), 8.18 (br d, J=7.1 Hz, 1H), 8.07 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.49 - 7.40 (m, 2H), 7.36 (d, J=7.8 Hz, 2H), 7.29 - 7.17 (m, 4H), 6.91 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 6.30 (d, J=10.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.75 - 5.56 (m, 1H), 5.53 (br d, J=3.1 Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 4.95 (d, J=4.8 Hz, 1H), 4.51 (d, J=9.6 Hz, 1H), 4.40 - 4.09 (m, 6H), 3.96 - 3.85 (m, 4H), 2.27 - 2.20 (m, 3H), 2.09 - 2.01 (m, 2H), 1.90 (br d, J=7.5 Hz, 2H), 1.78 - 1.65 (m, 4H), 1.63 - 1.63 (m, 1H), 1.50 (s, 4H), 1.30 - 1.19 (m, 6H), 0.86 (s, 3H).

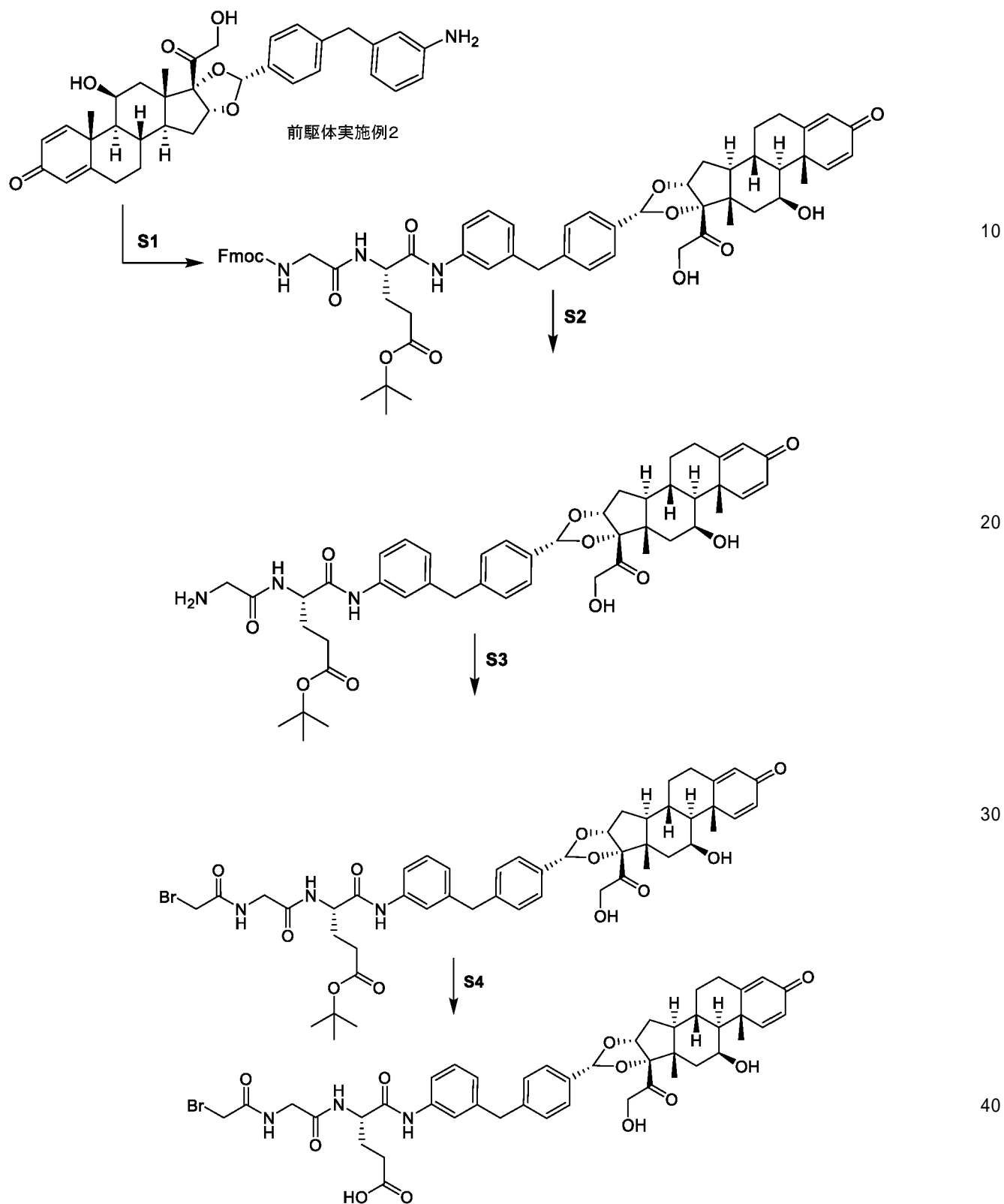
【 0 2 5 3 】

10

[前駆体実施例 4 3] (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸

【 0 2 5 4 】

【化 4 2】



【 0 2 5 5】

ステップ1: tert - ブチル (S) - 4 - (2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イ
ル) メトキシ) カルボニル) アミノ) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R ,
6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 7 - ヒドロ
キシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4
, 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1

H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。(S) - 2 - (2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) アセトアミド) - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキソペンタン酸 (508 mg、1.053 mmol) のジメチルホルムアミド (5 mL) 中溶液に、2, 4, 6 - トリプロピル - 1, 3, 5, 2, 4, 6 - トリオキサトリホスフィン 2, 4, 6 - トリオキシド (1117 mg、1.775 mmol) 及びトリエチルアミン (0.367 mL、2.63 mmol) を 0 で加えた。反応物を 25 で 30 分間撹拌した。前駆体実施例 2 ((6 a R, 6 b S, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a - ジメチル - 1, 2, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 4 - オン) (500 mg、0.878 mmol) を 25 で加え、反応物を 25 で 2 時間撹拌した。6 つの追加バイアルを上に記載されているように設定した。すべての 7 つの反応混合物を合わせ、分取 HPLC (方法 A A 7) で精製して、表題化合物を生成した (2 g、31 % 収率)。LCMS (方法 A A 13) R t = 1.370 分、m / z 1016.5 (M + H) ⁺。Fmoc = フルオレニルメチルオキシカルボニル。

10

20

30

【 0256 】

ステップ 2 : t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R, 6 b S, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R, 6 b S, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (350 mg、0.338 mmol) のアセトニトリル (4 mL) 中溶液に、ピペリジン (1 mL、5.05 mmol) を 25 で加えた。反応物を 25 で 15 分間撹拌し、次いでトリフルオロ酢酸を pH = 5 まで加えた。1 つの追加バイアルを上に記載されているように設定した。両方の反応混合物を合わせ、分取 HPLC (方法 A A 8) で精製し、移動相をそのまま凍結乾燥させて、表題化合物を生成した (200 mg、13 % 収率)。LCMS (方法 A A 13) R t = 1.063 分、m / z 812.4 (M + H) ⁺。

40

50

【 0257 】

ステップ 3 : t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R, 6 b S, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。2 - プロモ酢酸 (68.5 mg、0.493 mmol) のジメチルホルムアミド (2 mL) 中溶液に、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1, 2 - ジヒドロキノリン (122 mg、0.493 mmol) を 25 で加えた。混合物を 25 で 30 分間撹拌し、次いで t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R, 6 b S, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R,

1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (2 0 0 m g 、 0 . 2 4 6 m m o l) を加えた。反応物を 2 5 で 1 . 5 時間撹拌した。反応物を酢酸エチル (1 0 0 m L) で希釈し、水性 H B r (1 M 、 2 × 1 5 0 m L) 、水性 N a H C O ₃ (2 0 0 m L) 、及びブライン (2 0 0 m L) で洗浄した。有機層を (N a ₂ S O ₄) 、濾過し、濃縮して表題化合物を生成した (2 0 0 m g 、 8 7 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 2 0 1 分、 m / z 9 3 4 . 3 (M + H) ⁺。

10

【 0 2 5 8 】

ステップ 4 : (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノ酸の合成。tert - ブチル (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (2 0 0 m g 、 0 . 2 1 4 m m o l) のジクロロメタン (2 m L) 中溶液に、トリフルオロ酢酸 (0 . 7 m L 、 9 . 0 9 m m o l) を 2 5 で加えた。反応物を 2 5 で 1 時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、生成した残渣を分取 H P L P (方法 A A 2) で精製した。移動相を凍結乾燥して、表題化合物を生成した (4 4 m g 、 2 3 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 4) R t = 2 . 9 7 6 分、 m / z 8 7 6 . 1 (M + H) ⁺。1H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) . 9.88 (br s, 1H), 8.52 (br s, 1H), 8.24 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 7.51 - 7.14 (m, 9H), 6.92 (br d, J=7.1 Hz, 1H), 6.16 (br d, J=9.9 Hz, 1H), 5.93 (br s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.91 (br d, J=4.2 Hz, 1H), 4.77 (br s, 1H), 4.49 (br d, J=19.6 Hz, 1H), 4.38 (br d, J=5.7 Hz, 1H), 4.29 (br s, 1H), 4.17 (br d, J=19.4 Hz, 1H), 3.91 (br d, J=16.8 Hz, 3H), 3.79 (br s, 2H), 2.37 - 2.18 (m, 4H), 2.15 - 1.92 (m, 4H), 1.87 - 1.65 (m, 6H), 1.39 (br s, 3H), 1.13 - 0.96 (m, 2H), 0.86 (br s, 3H) .

20

30

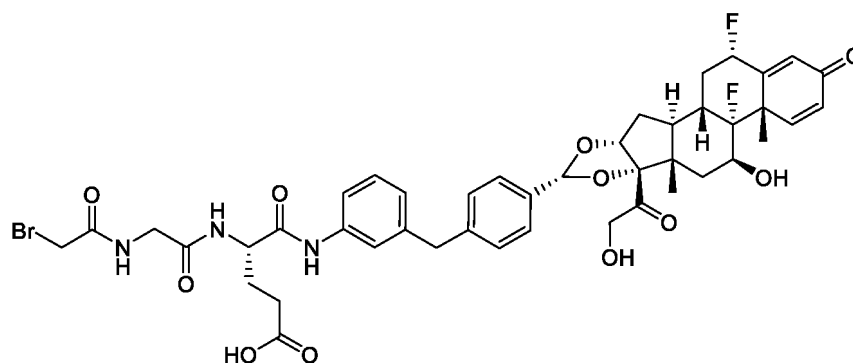
【 0 2 5 9 】

[前駆体実施例 2 4] (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸

40

【 0 2 6 0 】

【化 4 3】



10

【0261】

(2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル)フェニル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 1, 2, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 4H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 4 - オンを使用して、前駆体実施例 43 と類似の経路を使用して調製した。

L C M S (方法 A A 4) R t = 2.948 分、m / z 914.2 (M + H)⁺。 ¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) = 9.89 (s, 1H), 8.53 (t, J=5.6 Hz, 1H), 8.25 (d, J=7.9 Hz, 1H), 7.47 (br d, J=8.4 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.36 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.29 - 7.23 (m, 3H), 7.20 (t, J=7.8 Hz, 1H), 7.02 - 6.86 (m, 1H), 6.30 (dd, J=1.9, 10.3 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.76 - 5.60 (m, 1H), 5.63 - 5.56 (m, 1H), 5.54 - 5.47 (m, 1H), 5.45 (s, 1H), 4.94 (d, J=5.1 Hz, 1H), 4.51 (d, J=19.6 Hz, 1H), 4.42 - 4.35 (m, 1H), 4.25 - 4.11 (m, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.85 - 3.74 (m, 3H), 2.63 - 2.52 (m, 2H), 2.42 (br d, J=1.8 Hz, 1H), 2.30 - 2.16 (m, 4H), 2.07 - 1.90 (m, 2H), 1.87 - 1.61 (m, 4H), 1.55 (br s, 1H), 1.49 (s, 3H), 0.86 (s, 3H).

20

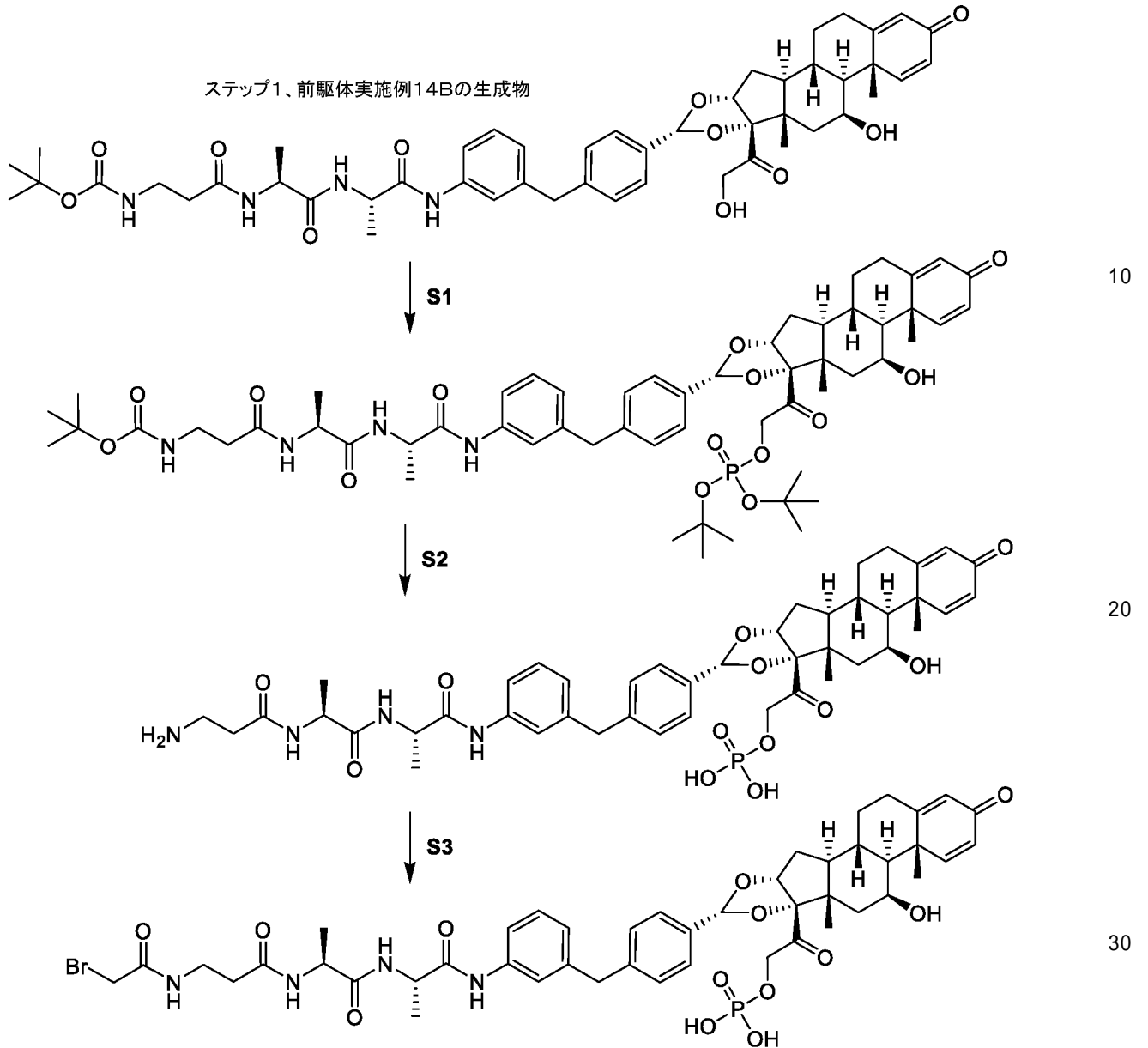
【0262】

[前駆体実施例 44] 2 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (3 - (2 - プロモアセトアミド)プロパンアミド)プロパンアミド)プロパンアミド)ベンジル)フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩

30

【0263】

【化 4 4】



【0264】

ステップ1: tert-ブチル(3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-(ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-7-ヒドロキシ-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-オキソプロピル)カルバメートの合成。前駆体実施例14B、ステップ1の生成物(tert-ブチル(3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-(6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-3-オキソプロピル)カルバメート)(500mg、0.566mmol)のジクロロメタン(5mL)中溶液に、1H-

テトラゾール (397 mg、5.66 mmol) 及びジ-tert-ブチルジエチルホスホラミダイト (1.694 g、6.79 mmol) を 25 で加えた。反応物を 25 で 1 時間攪拌し、次いで過酸化水素 (353 mg、3.11 mmol) を加えた。反応物を 2 時間攪拌した。1 つの追加のバイアルを上に記載されているように設定した。両方の反応混合物を合わせ、分取 HPLC (方法 A A 7) で精製して、表題化合物を生成した (1 g、82 % 収率)。LCMS (方法 A A 13) Rt = 1.300 分、m/z 1075.8 (M+H)⁺。

【0265】

ステップ 2: 2 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (3 - アミノ p r o p a n a m i d o) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト [2', 1': 4, 5] インデノ [1, 2-d] [1, 3] ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。tert-ブチル (3 - ((S) - 1 - ((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ-tert-ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4, 5] インデノ [1, 2-d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) カルバメート (600 mg、0.558 mmol) のジクロロメタン (6 mL) 中溶液に、トリフルオロ酢酸 (2 mL、26.0 mmol) を 25 で加え、反応物を 25 で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、生成した残渣を分取 HPLC (方法 A A 6) で精製した。移動相を凍結乾燥して、表題化合物を生成した (350 mg、73 % 収率)。LCMS (方法 A A 13) Rt = 0.986 分、m/z 863.3 (M+H)⁺。

【0266】

ステップ 3: 2 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (3 - (2 - プロモアセトアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト [2', 1': 4, 5] インデノ [1, 2-d] [1, 3] ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。2 - プロモ酢酸 (16.1 mg、0.116 mmol) のジメチルホルムアミド (1 mL) 中溶液に、2 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (3 - アミノプロパンアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト [2', 1': 4, 5] インデノ [1, 2-d] [1, 3] ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩 (100 mg、0.116 mmol)、2 - プロモ - 1 - エチルピリジン - 1 - イウムテトラフルオロボレート (34.9 mg、0.127 mmol) 及び N - エチル - N - イソプロピルプロパン - 2 - アミン (30.0 mg、0.232 mmol) を 25 で加え、混合物を 25 で 2 時間攪拌した。生成した残渣を分取 HPLC (方法 A A 2) で精製した。移動相を凍結乾燥させ、表題化合物を生成した (65 mg、30 % 収率)。LCMS (方法 A A 4) Rt = 2.932 分、m/z 985.2 (M+H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz): 9.79 - 9.63 (m, 1H), 8.31 - 8.24 (m, 1H), 8.21 - 8.04 (m, 2H), 7.51 - 7.41 (m, 2H), 7.36 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.29 (d, J=10.1 Hz, 1H), 7

10

20

30

40

50

.24 - 7.12 (m, 3H), 6.89 (br d, J=7.7 Hz, 1H), 6.14 (dd, J=1.5, 10.1 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.95 - 4.78 (m, 3H), 4.54 (br dd, J=8.0, 18.2 Hz, 1H), 4.38 - 4.12 (m, 4H), 3.87 (s, 2H), 3.80 (d, J=3.3 Hz, 2H), 3.25 (br d, J=6.8 Hz, 2H), 2.60 - 2.50 (m, 2H), 2.13 - 1.96 (m, 2H), 1.84 - 1.58 (m, 6H), 1.37 (s, 3H), 1.25 (dd, J=2.1, 7.2 Hz, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.06 - 0.98 (m, 2H), 0.85 (s, 3H).

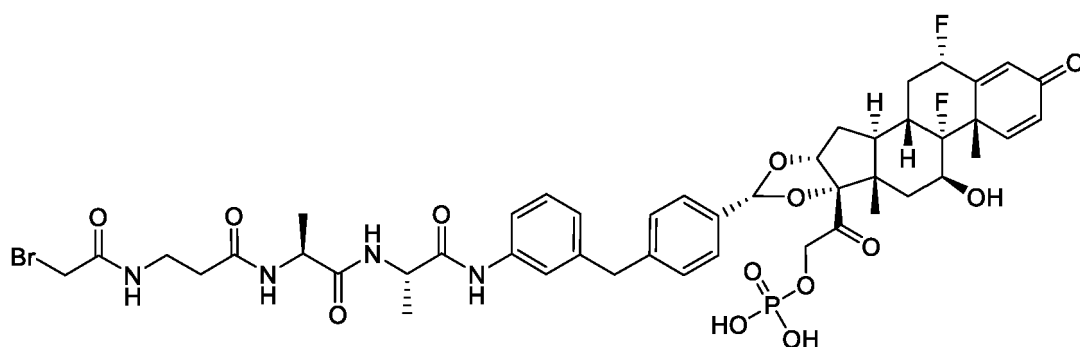
【0267】

[実施例25B] 2 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - (S) - 2 - (S) - 2 - (3 - (2 - プロモアセトアミド)プロパンアミド)プロパンアミド)ベンジル)フェニル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩

10

【0268】

【化45】



20

【0269】

2 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル)フェニル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩を使用して、前駆体実施例44と類似の経路を使用して調製した。LCMS (方法AA4) Rt = 2.958分、m/z 1021.3 (M+H)⁺. ¹H (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) = 9.83 - 9.70 (m, 1H), 8.34 - 8.16 (m, 2H), 8.15 - 8.06 (m, 1H), 7.56 - 7.40 (m, 2H), 7.36 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.30 - 7.16 (m, 4H), 6.91 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 6.30 (dd, J=1.5, 10.1 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.75 - 5.56 (m, 2H), 5.53 (s, 1H), 4.99 - 4.87 (m, 2H), 4.59 (dd, J=8.4, 18.1 Hz, 1H), 4.43 - 4.15 (m, 4H), 3.89 (s, 2H), 3.82 (d, J=3.5 Hz, 2H), 3.33 - 3.21 (m, 2H), 2.73 - 2.60 (m, 1H), 2.39 - 2.14 (m, 5H), 2.11 - 2.00 (m, 1H), 1.78 - 1.63 (m, 3H), 1.57 - 1.45 (m, 4H), 1.27 (dd, J=2.3, 6.9 Hz, 3H), 1.19 (d, J=7.1 Hz, 3H), 0.88 (s, 3H).

30

40

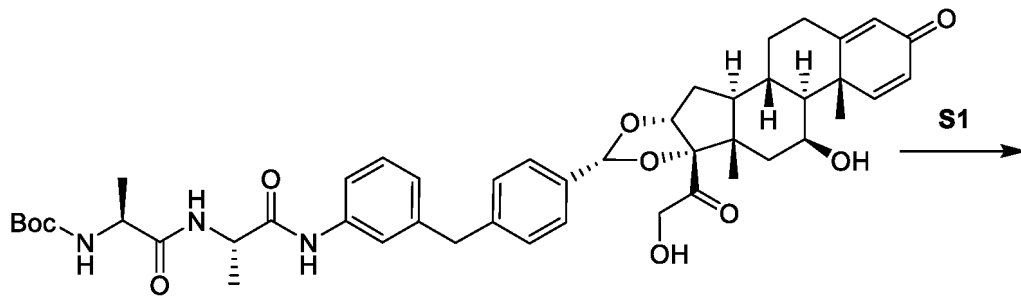
50

[前駆体実施例45] 2 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 10 - (4 - (3 - (S) - 2 - (S) - 2 - (2 - プロモアセトアミド)プロパンアミド)プロパンアミド)ベンジル)フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 8bH - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 8b - イル) - 2 - オキソエチルリ

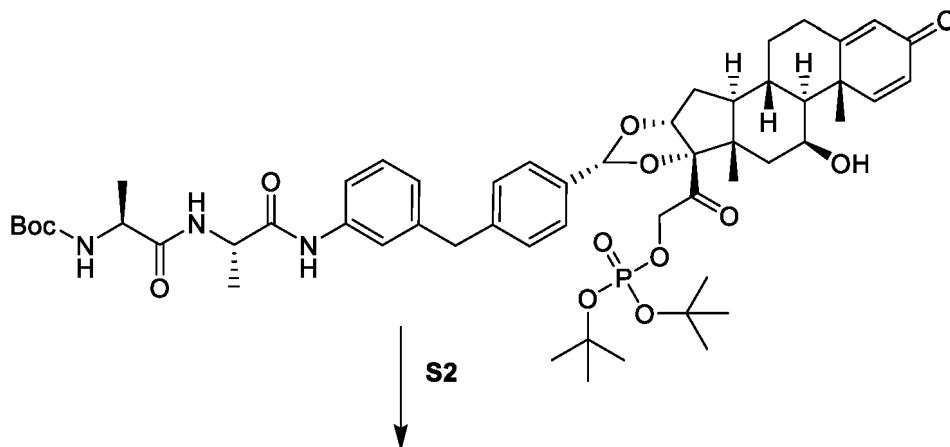
ン酸二水素塩

【 0 2 7 0 】

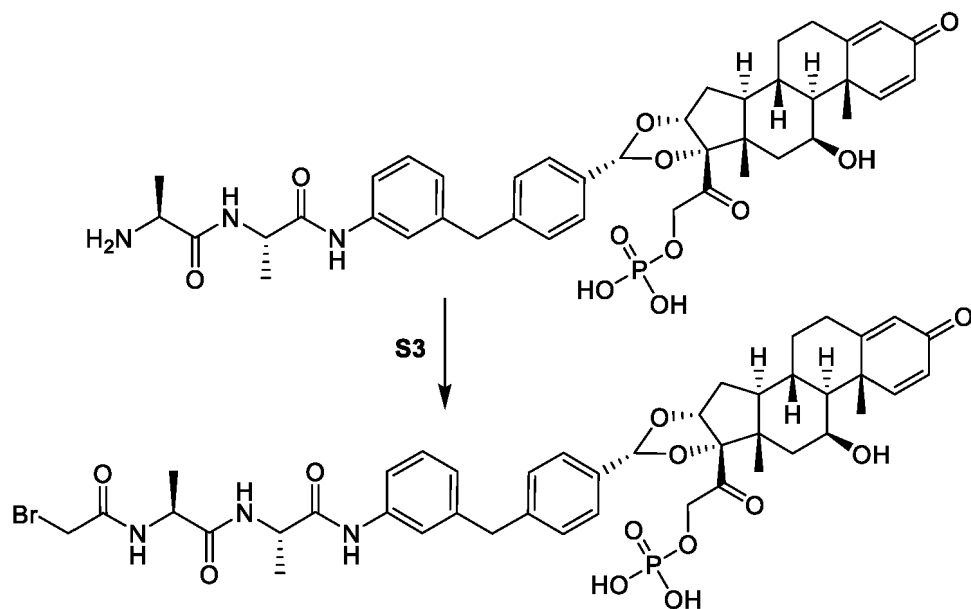
【 化 4 6 】



10



20



30

40

【 0 2 7 1 】

ステップ1: tert-ブチル((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-7-ヒドロキシ-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメートの合成。実施例14B、ステップ1の生成物(tert-ブチル((S)-1-((

50

(S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) カルバメート) (4 0 0 m g , 0 . 4 9 3 m m o l) のジメチルホルムアミド (4 m L) 中溶液に、1 H - テトラゾール (3 4 5 m g , 4 . 9 3 m m o l) 及びジ - t e r t - ブチルジエチルホスホラミダイト (1 4 7 4 m g , 5 . 9 1 m m o l) を 2 5 で加えた。混合物を 2 5 で 2 時間攪拌し、次いで過酸化水素 (3 0 7 m g , 2 . 7 1 m m o l) を 0 で混合物に加えた。反応物を 2 5 で 2 時間攪拌した。4 つの追加バイアルを上に記載されているように設定した。すべての 5 つの反応混合物を合わせ、氷水 (1 L) に注入し、濾過して、表題化合物を生成した (1 . 6 g , 6 5 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 3 4 4 分、m / z 1 0 0 4 . 5 (M + H) ⁺。B o c = t e r t - ブトキシカルボニル。

【 0 2 7 2 】

ステップ 2 : 2 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - アミノプロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。t e r t - ブチル ((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) カルバメート (1 . 5 g , 1 . 4 9 4 m m o l) のジクロロメタン (1 0 m L) 中溶液に、トリフルオロ酢酸 (3 m L , 3 8 . 9 m m o l) を 2 5 で加えた。反応物を 2 5 で 2 時間攪拌した。混合物を分取 H P L C (方法 A A 1 0) で精製して、表題化合物を生成した (4 0 0 m g , 3 4 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t 1 . 6 0 2 分、m / z 7 9 2 . 4 (M + H) ⁺。

【 0 2 7 3 】

ステップ 3 : 2 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (2 - プロモアセトアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。2 - プロモ酢酸 (6 3 . 2 m g , 0 . 4 5 5 m m o l) のジメチルホルムアミド (1 . 5 m L) 中溶液に、2 - プロモ - 1 - エチルピリジン - 1 - イウムテトラフルオロボレート (1 2 5 m g , 0 . 4 5 5 m m o l) 、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (0 . 1 5 9 m L , 0 . 9 0 9 m m o l) 及び 2 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - アミノプロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩 (2 4 0 m g , 0 . 3 0 3 m m o l) を 2 5 で加え、混合物を 2 5 で

2 時間撹拌した。生成した混合物を分取 H P L C (方法 A A 9) で精製し、表題化合物を生成した (1 0 0 m g 、 収率 3 6 . 0 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 4) R t = 2 . 8 9 0 分、 m / z 9 1 4 . 2 (M + H) ⁺ 。 ¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) 0.84-0.90 (m, 3H), 0.98-1.11 (m, 2H), 1.18-1.23 (m, 3H), 1.28 (d, J=7.09 Hz, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.60-1.86 (m, 5H), 1.96-2.17 (m, 2H), 2.32 (br d, J=1.71 Hz, 1H), 2.52-2.59 (m, 2H), 3.86-3.94 (m, 4H), 4.26-4.40 (m, 3H), 4.56 (dd, J=18.22, 8.07 Hz, 1H), 4.82-4.96 (m, 3H), 5.48 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 6.16 (dd, J=10.15, 1.71 Hz, 1H), 6.91 (br d, J=7.58 Hz, 1H), 7.17-7.26 (m, 3H), 7.31 (d, J=10.03 Hz, 1H), 7.35-7.52 (m, 4H), 8.19-8.42 (m, 1H), 8.45-8.57 (m, 1H), 9.71-9.88 (m, 1H) .

10

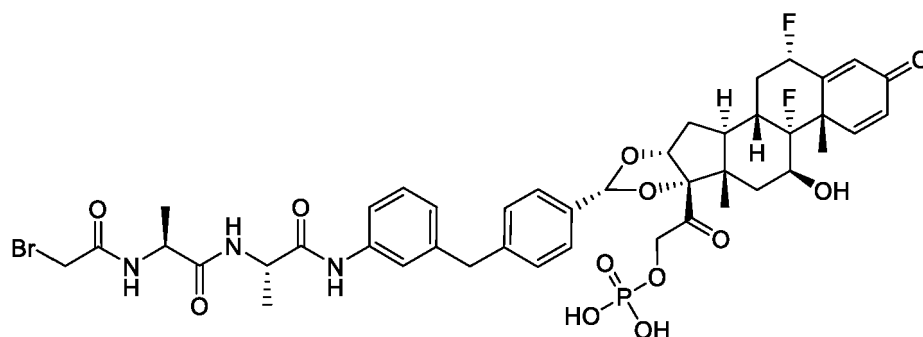
【 0 2 7 4 】

[前駆体実施例 2 6] 2 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (2 - プロモアセトアミド) プロパンアミド) プロパンアミド) ベンジル) フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成

【 0 2 7 5 】

20

【 化 4 7 】



30

【 0 2 7 6 】

2 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩を使用して、前駆体実施例 4 5 と類似の経路を使用して調製した。 L C M S (方法 A A 4) R t = 2 . 9 2 4 分、 m / z 9 5 0 . 3 (M + H) ⁺ 。 ¹H NMR (メタノール-d₄, 400 MHz) 7.44 - 7.38 (m, 1H), 7.36 - 7.31 (m, 4H), 7.23 - 7.17 (m, 3H), 6.93 (br d, J=7.6 Hz, 1H), 6.35 - 6.33 (m, 2H), 5.61 - 5.47 (m, 2H), 5.03 (s, 1H), 5.01-4.97 (m, 1H), 4.80 - 4.76 (m, 1H), 4.43 - 4.30 (m, 3H), 3.94 (s, 2H), 3.88 - 3.81 (m, 2H), 2.76 - 2.66 (m, 1H), 2.42 - 2.38 (m, 3H), 1.81 - 1.79 (m, 3H), 1.78 - 1.75 (m, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.42 - 1.37 (m, 6H), 1.01 (s, 3H) .

40

【 0 2 7 7 】

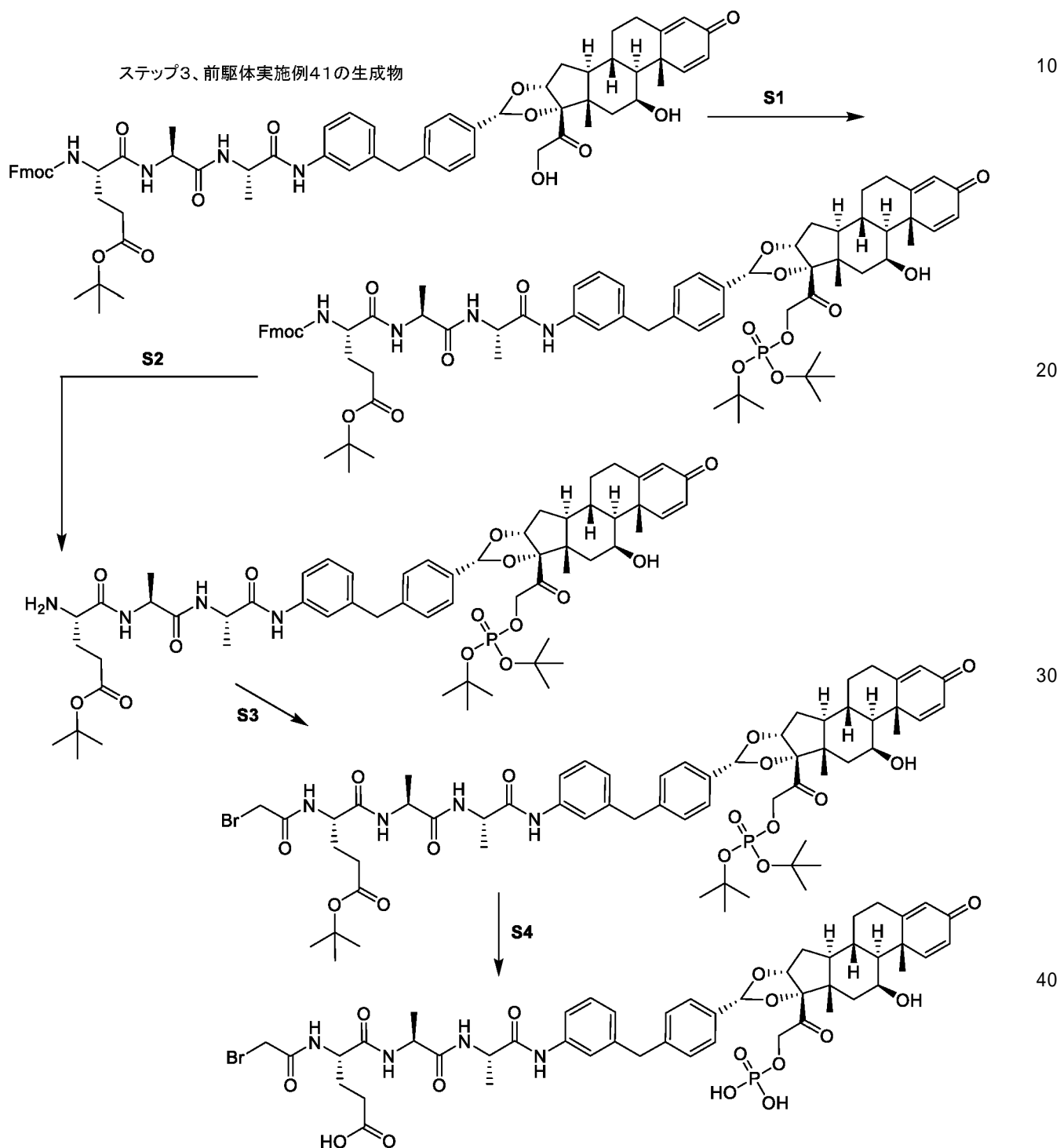
[前駆体実施例 4 6] (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ

50

ソ - 8 b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a ,
8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 ,
5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル
) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル
) アミノ) - 5 - オキソペンタン 酸

【 0 2 7 8 】

【 化 4 8 】



【 0 2 7 9 】

ステップ1: tert - ブチル (S) - 4 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メ
トキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 -
((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S)

- 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。前駆体実施例 4 2、ステップ 3 の生成物 (t e r t - ブチル (S) - 4 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート) (5 0 0 m g 、 0 . 4 4 7 m m o l) のジメチルホルムアミド (2 m L) 中溶液に、1 H - テトラゾール (3 1 3 m g 、 4 . 4 7 m m o l) 及びジ - t e r t - ブチルジエチルホスホラミダイト (1 . 3 3 7 g 、 5 . 3 6 m m o l) を 2 0 で加えた。反応物を 2 0 で 1 時間攪拌し、次いで過酸化水素 (2 7 9 m g 、 2 . 4 5 7 m m o l) を加え、反応物を追加の 1 時間を攪拌した。反応物を分取 H P L C (方法 A A 6) で精製して、表題化合物を生成した (4 5 0 m g 、 7 7 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 5 2 4 分、m / z 1 3 1 1 . 6 (M + H) ⁺。

10

20

【 0 2 8 0 】

ステップ 2 . t e r t - ブチル (S) - 4 - アミノ - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。t e r t - ブチル (S) - 4 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (4 5 0 m g 、 0 . 3 4 3 m m o l) のアセトニトリル (2 m L) 中溶液にピペリジン (0 . 4 m L) を 0 で加えた。反応物を 0 で 2 0 分間攪拌し、次いで濃縮して粗生成物を生成し、これを石油エーテル (2 0 m L) 中で 1 時間攪拌した。固体を濾過によって収集して、減圧下で乾燥させて、表題化合物を生成した (2 5 0 m g 、 6 7 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 2 4 4 分、m / z 1 0 8 9 . 5 (M + H) ⁺。

30

40

【 0 2 8 1 】

ステップ 3 : t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6 a R , 6 b S , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソ

50

ール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) ア
 ミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。
 tert - ブチル (S) - 4 - アミノ - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 -
 (4 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12
 bS) - 8b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7
 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a
 , 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4
 , 5] インドノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニ
 ル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イ
 ル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (250mg、0.23mmol) のジメチル
 ホルムアミド (3mL) 中溶液に、2 - プロモ酢酸 (47.8mg、0.344mmol)
) 及びエチル 2 - エトキシキノリン - 1 (2H) - カルボキシレート (68.1mg、0
 .275mmol) を加えた。混合物を 25 で 2 時間攪拌し、次いで分取 HPLC (方
 法 AA 11) で精製して、表題化合物を生成した (120mg、43% 収率)。LCMS
 (方法 AA 13) Rt = 1.351 分、m/z 1211.4 (M + H)⁺。

10

【0282】

ステップ 4: (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S)
) - 1 - ((3 - (4 - ((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11a
 R, 12aS, 12bS) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 8b
 - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 1
 1a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4, 5] イ
 ンドノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ
) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ
) - 5 - オキソペンタン酸の合成。tert - ブチル (S) - 4 - (2 - プロモアセトア
 ミド) - 5 - (((S) - 1 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((6aR, 6bS, 7
 S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ -
 tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジ
 メチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a
 , 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1': 4, 5] インドノ [1, 2 - d]
 [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソプロ
 パン - 2 - イル) アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 5 - オキソペン
 タノエート (120mg、0.099mmol) のジクロロメタン (3mL) 中溶液に、
 トリフルオロ酢酸 (1mL) を加え、混合物を 20 で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で
 除去し、粗生成物を分取 HPLC (方法 AA 12) で精製して、表題化合物を生成した (32mg、30% 収率)。
 LCMS (方法 AA 4) Rt = 2.909 分、m/z = 1041.9 (M + H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) 9.88 -
 9.67 (m, 2H), 8.47 (dd, J=4.3, 7.6 Hz, 2H), 8.26 (d, J=7.1 Hz, 1H),
 8.21 - 8.12 (m, 1H), 8.28 - 8.03 (m, 1H), 8.06 (d, J=7.1 Hz, 1H),
 7.49 - 7.39 (m, 5H), 7.36 (d, J=8.2 Hz, 5H), 7.30 (d, J=10.1 Hz,
 2H), 7.22 (br d, J=8.2 Hz, 1H), 7.24 - 7.15 (m, 1H), 7.19 - 7.14
 (m, 1H), 6.88 (d, J=7.7 Hz, 2H), 6.15 (d, J=11.7 Hz, 2H), 5.91 (s
 , 2H), 5.46 (s, 2H), 4.95 - 4.80 (m, 7H), 4.55 (dd, J=8.0, 18.0 Hz
 , 2H), 4.38 - 4.31 (m, 1H), 4.31 - 4.19 (m, 3H), 3.93 - 3.85 (m,
 4H), 2.66 (s, 2H), 2.31 (br s, 1H), 2.24 (br t, J=8.2 Hz, 2H), 2
 .33 - 2.18 (m, 1H), 2.17 - 1.94 (m, 5H), 1.87 (br s, 2H), 1.83 -
 1.59 (m, 14H), 1.37 (s, 7H), 1.28 - 1.17 (m, 15H), 1.00 (br d, J
 =11.2 Hz, 5H), 0.86 (s, 7H)。

20

30

40

【0283】

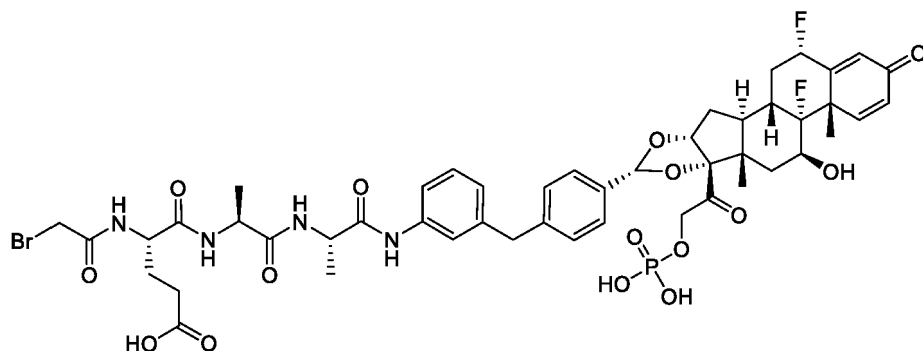
[前駆体実施例 27] (S) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - (((S) - 1
 - (((S) - 1 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS,

50

10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 2, 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a, 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 8 b - (2 - (ホスホノオキシ)アセチル) - 2, 4, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2 - d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル)ベンジル)フェニル)アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル)アミノ) - 1 - オキソプロパン - 2 - イル)アミノ) - 5 - オキソペンタン酸

【0284】

【化49】



10

【0285】

(2 S, 6 a S, 6 b R, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 10 - (4 - (3 - アミノベンジル)フェニル) - 2, 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a, 8 a - ジメチル - 1, 2, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 8 b, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 4 H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2 - d][1, 3]ジオキソール - 4 - オンを使用して、前駆体実施例46と類似の経路を使用して調製した。

20

【0286】

L C M S (方法 A A 4) R t = 2.905 分、m / z 1079.1 (M + H)⁺。 ¹H NMR (メタノール-d₄, 400 MHz) = 7.48 - 7.44 (m, 1H), 7.40 - 7.30 (m, 4H), 7.25 - 7.16 (m, 3H), 6.93 (br d, J=7.6 Hz, 1H), 6.37 - 6.30 (m, 2H), 5.64 - 5.52 (m, 2H), 5.04 (br d, J=4.4 Hz, 1H), 5.01 - 4.95 (m, 1H), 4.81 - 4.72 (m, 1H), 4.43 - 4.25 (m, 4H), 4.13 - 3.99 (m, 1H), 3.97 - 3.91 (m, 2H), 3.91 - 3.77 (m, 2H), 2.79 - 2.61 (m, 1H), 2.45 - 2.33 (m, 4H), 2.27 (br d, J=13.7 Hz, 1H), 2.16 - 2.03 (m, 1H), 2.00 - 1.88 (m, 1H), 1.83 - 1.74 (m, 3H), 1.68 - 1.54 (m, 4H), 1.46 - 1.36 (m, 6H), 1.01 (s, 3H).

30

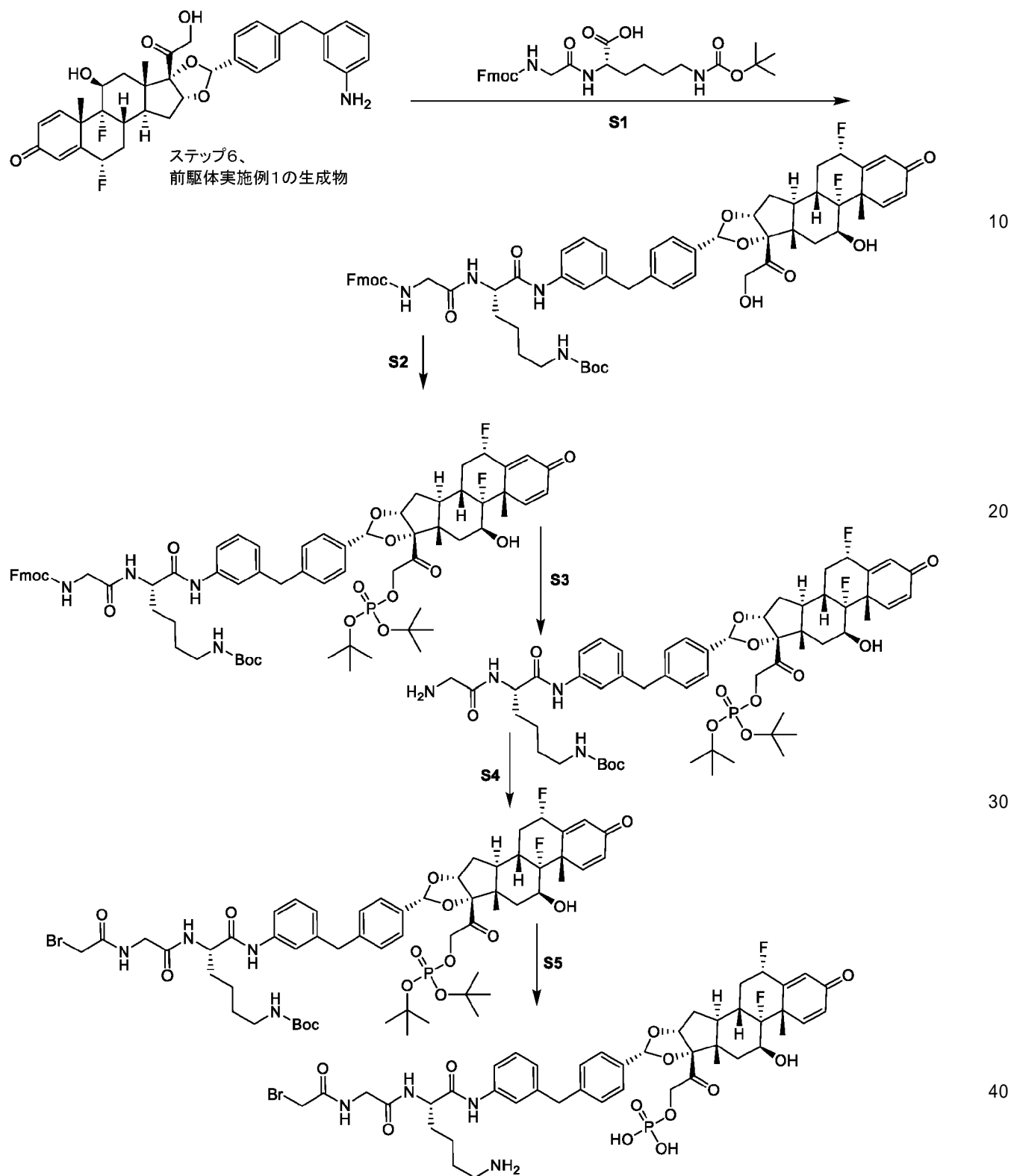
【0287】

[前駆体実施例39] 2 - ((2 S, 6 a S, 6 b R, 7 S, 8 a S, 8 b S, 10 R, 11 a R, 12 a S, 12 b S) - 10 - (4 - (3 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - (2 - (2 - プロモアセトアミド)アセトアミド)ヘキサナムド)ベンジル)フェニル) - 2, 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a, 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1, 2, 4, 6 a, 6 b, 7, 8, 8 a, 11 a, 12, 12 a, 12 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2 - d][1, 3]ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩

40

【0288】

【化 5 0】



【 0 2 8 9 】

ステップ1：tert-ブチル((S)-5-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-2, 6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a, 8a-ジメチル-4-オキソ-2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2', 1':4, 5]インデノ[1, 2-

d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメートの合成。 N^2 -((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)グリシル)- N^6 -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リシン(5.58g、8.26mmol)のジメチルホルムアミド(60mL)中溶液に、2,4,6-トリプロピル-1,3,5,2,4,6-トリオキサトリホスフィナン2,4,6-トリオキシド(10.51g、16.51mmol)及びトリエチルアミン(3.45mL、24.77mmol)を0 で加えた。反応物を25 で1時間攪拌し、次いで前駆体実施例1、ステップ6の生成物((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-アミノベンジル)フェニル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-4H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-4-オン)(5g、8.26mmol)を反応物に25 で加えた。反応物を25 で5時間攪拌した。6つの追加バイアルを上に記載されているように設定した。すべての7つの反応物を合わせ、分取HPLC(方法AA14)で精製して、表題化合物を生成した(24g、25%収率)。LCMS(方法AA13)Rt=1.295分、m/z1095.6(M+H-18)⁺。

10

【0290】

ステップ2:tert-ブチル((S)-5-(2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメートの合成。tert-ブチル((S)-5-(2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメート(3g、2.69mmol)のジメチルホルムアミド(30mL)中溶液に、1H-テトラゾール(1.888g、26.9mmol)及びジ-tert-ブチルジエチルホスホラミダイト(8.06g、32.3mmol)を25 で加えた。反応物を25 で3.5時間攪拌し、次いで過酸化水素(224mg、1.976mmol)を加え、混合物を30分間攪拌した。6つの追加バイアルを上に記載されているように設定した。すべての7つの反応物を合わせ、分取HPLC(方法AA7)で精製して、表題化合物を生成した(10g、37%収率)。LCMS(方法AA13)Rt=1.421分、m/z1305.7(M+H)⁺。

20

30

40

【0291】

ステップ3:tert-ブチル((S)-5-(2-アミノアセトアミド)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((ジ-tert-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメートの合成。tert-ブチル((S)-5-(2-((((9H-フルオレン-9-イル)メ

50

トキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インドノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル)ベンジル)フェニル)アミノ) - 6 - オキソヘキシル)カルバメート (2 . 5 g 、 1 . 9 6 9 m m o l) のアセトニトリル (1 0 m L) 中溶液に、ピペリジン (2 m L 、 1 . 9 6 9 m m o l) を 2 5 で加えた。反応物を 2 5 で 1 時間撹拌した。3つの追加のバイアルを上に記載されているように設定した。すべての4つの反応物を合わせ、濃縮して残渣を生成し、これを石油エーテル (3 0 m L) 中で 2 時間撹拌した。固体を濾過によって収集し、減圧下で乾燥させて、表題化合物 (7 g 、 7 0 % 収率) を得た。反応物に対する L C M S (E S I +) : m / z 1 0 8 3 . 5 (M + H) ⁺、R t : 1 . 1 7 5 分。

【 0 2 9 2 】

ステップ 4 : t e r t - ブチル ((S) - 5 - (2 - (2 - プロモアセトアミド)アセトアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インドノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル)ベンジル)フェニル)アミノ) - 6 - オキソヘキシル)カルバメートの合成。2 - プロモ酢酸 (0 . 9 2 9 g 、 6 . 6 8 m m o l) のジメチルホルムアミド (3 5 m L) 中溶液に、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1 , 2 - ジヒドロキノリン (1 . 6 5 3 g 、 6 . 6 8 m m o l) を 2 5 で加えた。混合物を 2 5 で 1 時間撹拌した。次いで、t e r t - ブチル ((S) - 5 - (2 - アミノアセトアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インドノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル)ベンジル)フェニル)アミノ) - 6 - オキソヘキシル)カルバメート (3 . 5 g 、 3 . 3 4 m m o l) を反応物に加えた。反応物を 2 5 で 2 時間撹拌した。L C M S は反応が完了したことを示した。反応物をジクロロメタン (1 0 0 m L) で希釈し、水性 H B r (1 M 、 2 x 8 0 m L) 、水性 N a H C O ₃ (6 0 m L) 、及びブライン (6 0 m L) で洗浄した。有機層を脱水し (N a ₂ S O ₄) 、濃縮して表題化合物を生成し (2 g 、 5 1 % 収率) 、これを次のステップでそのまま使用した。L C M S (方法 A A 1 3) R t = 1 . 3 1 8 分、m / z 1 2 0 5 . 5 (M + H) ⁺。

【 0 2 9 3 】

ステップ 5 : 2 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - (2 - プロモアセトアミド)アセトアミド)ヘキサナミド)ベンジル)フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インドノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩の合成。t e r t - ブチル ((S) - 5 - (2 - (2 - プロモアセトアミド)アセトアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4

10

20

30

40

50

、5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキシル)カルバメート(2g、1.661mmol)のジクロロメタン(10mL)中溶液に、トリフルオロ酢酸(5mL、64.9mmol)を25で加えた。反応物を25で40分間攪拌し、次いで蒸発乾固して、残渣を生成し、これを分取HPLC(方法AA17)で精製して、表題化合物を生成した(550mg、32%収率)。LCMS(方法AA13)Rt=2.313分、m/z993.1(M+H)⁺。¹H NMR(ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) ppm 0.90(s, 3 H) 1.19 - 1.41(m, 2 H) 1.43 - 1.62(m, 7 H) 1.64 - 1.77(m, 3 H) 1.84(br d, J=14.55 Hz, 1 H) 1.95 - 2.07(m, 1 H) 2.18 - 2.36(m, 3 H) 2.65 - 2.78(m, 3 H) 3.71 - 3.86(m, 3 H) 3.89(s, 2 H) 3.93(s, 2 H) 4.20(br d, J=9.48 Hz, 1 H) 4.33 - 4.41(m, 1 H) 4.59(br dd, J=18.41, 8.05 Hz, 1 H) 4.81(br dd, J=18.52, 8.60 Hz, 1 H) 4.94(d, J=4.63 Hz, 1 H) 5.50(s, 1 H) 5.54 - 5.76(m, 1 H) 6.13(s, 1 H) 6.29(dd, J=10.14, 1.32 Hz, 1 H) 6.95(d, J=7.72 Hz, 1 H) 7.15 - 7.28(m, 4 H) 7.30 - 7.41(m, 3 H) 7.51(br d, J=7.94 Hz, 1 H) 7.72(br s, 3 H) 8.21(br d, J=7.72 Hz, 1 H) 8.54(t, J=5.62 Hz, 1 H) 9.93(br d, J=2.65 Hz, 1 H)。

10

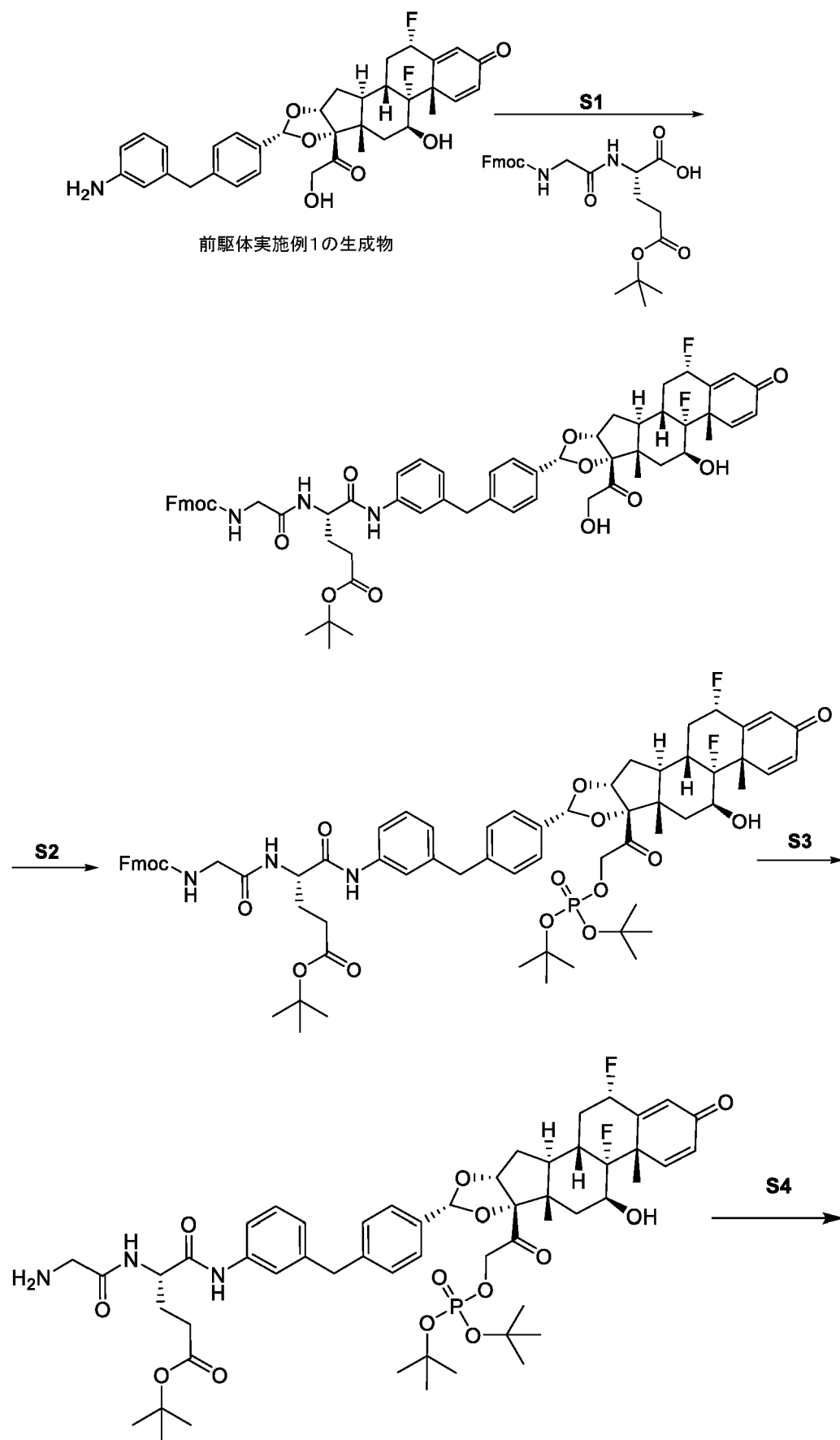
【0294】

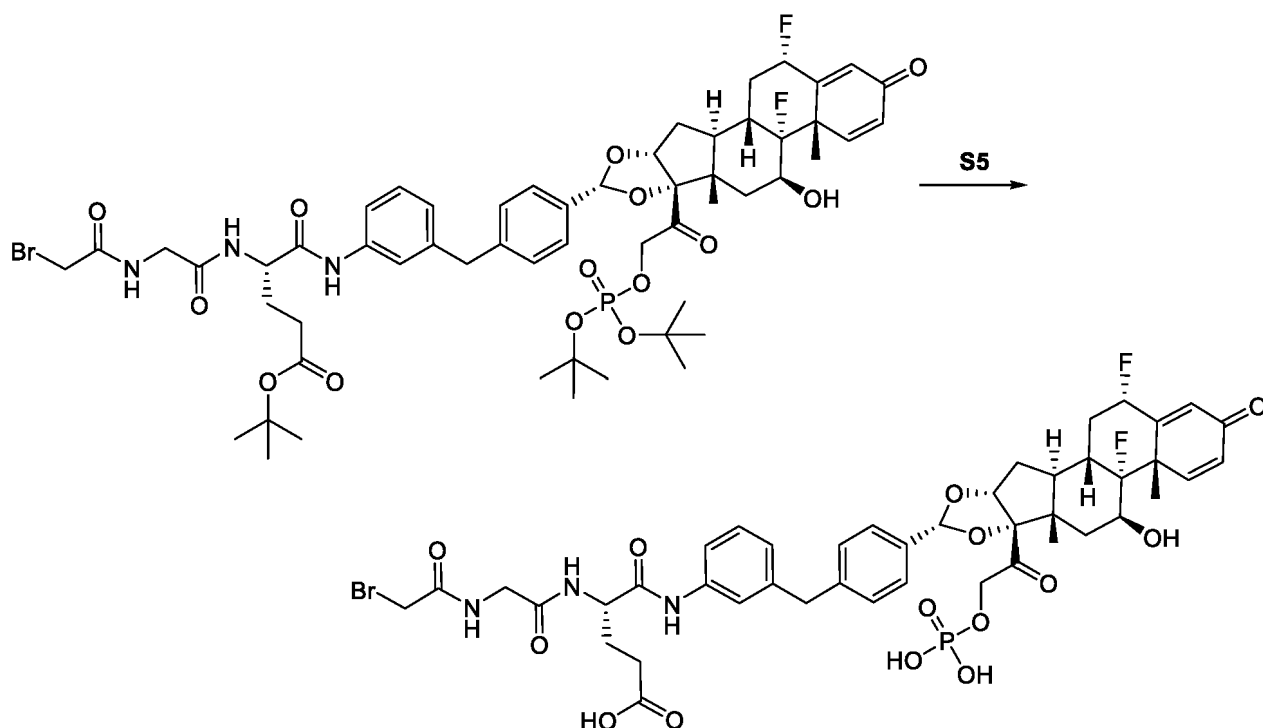
[前駆体実施例28](S)-4-(2-(2-プロモアセトアミド)アセトアミド)-5-((3-(4-(2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-8b-(2-(ホスホノオキシ)アセチル)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタン酸

20

【0295】

【化 5 1】





10

20

【0296】

ステップ1: *tert*-ブチル(S)-4-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-5-((3-(4-(2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-デカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキサール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-5-オキソペンタノエートの合成。前駆体実施例1の生成物((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-アミノベンジル)フェニル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-デカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキサール-4(2H)-オン)(500mg、0.826mmol)のジメチルホルムアミド(10mL)中溶液に、(S)-2-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-5-(*tert*-ブトキシ)-5-オキソペンタン酸(500mg、1.036mmol)、2,4,6-トリプロピル-1,3,5,2,4,6-トリオキサトリホスフィナン2,4,6-トリオキシド(1800mg、2.83mmol)及びトリエチルアミン(0.689mL、4.94mmol)を0 で加えた。反応混合物を20 で30分間攪拌し、次いで前駆体実施例1の追加の生成物(500mg、0.826mmol)を加えた。反応物を25 で12時間攪拌した。16回の同一の反応を実施し、反応物を合わせた。混合物を水(3L)に加え、酢酸エチル(3×500mL)で抽出した。層を分離し、有機層(Na_2SO_4)で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、黄色の固体として表題化合物を生成した(12g、11.21mmol、48.0%収率)。TLC(酢酸エチル)Rf0.48。

30

40

【0297】

ステップ2: *tert*-ブチル(S)-4-(2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)アセトアミド)-5-((3-(4-(2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((ジ-*tert*-ブトキシホスホリル)オキシ)アセチル)-2,6b-ジフ

50

ルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。(S) - t e r t - ブチル 4 - (2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (1 g 、 0 . 9 3 4 m m o l) のジメチルホルムアミド (5 m L) 中溶液に、 1 H - テトラゾール (0 . 6 5 5 g 、 9 . 3 4 m m o l) 及びジ - t e r t - ブチルジエチルホスホラミダイト (1 . 8 6 4 g 、 7 . 4 8 m m o l) を 2 5 で加えた。反応物を 2 5 で 2 . 5 時間攪拌し、次いで過酸化水素 (0 . 5 8 3 g 、 5 . 1 4 m m o l) を 0 で加えた。混合物を 2 5 で 1 時間攪拌した。 1 9 回の同一の反応を実施し、合わせた。混合物を水に加え、固体を濾過によって収集し、分取 H P L C で精製して、表題化合物を生成した (1 0 g 、 8 5 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 8) R t = 1 . 4 3 4 分、 m / z 1 2 6 2 . 5 (M + H) ⁺。

10

【 0 2 9 8 】

ステップ 3 : t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - アミノアセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。アセトニトリル (2 0 m L) 中 (S) - t e r t - ブチル 4 - (2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (1 0 g 、 7 . 9 2 m m o l) に、ピペリジン (4 m L 、 7 . 9 2 m m o l) を 2 5 で加えた。混合物を 2 0 分間攪拌し、濃縮し、石油エーテル (2 X 3 0 0 m L) で洗浄し、減圧下で乾燥させて、表題化合物を生成した (5 g 、 6 1 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 9) R t = 1 . 6 0 4 分、 m / z 1 0 4 0 . 7 (M + H) ⁺。

20

30

【 0 2 9 9 】

ステップ 4 : t e r t - ブチル (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエートの合成。 2 - プロモ酢酸 (0 . 1 3 4 g 、 0 . 9 6 1 m m o l) のジメチルホルムアミド (4 m L) 中溶液に、 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 . 2 3 8 g 、 0 . 9 6 1 m m o l) を 2 5 で加えた。混合物を 2 5 で 1 時間攪拌し、次いで (S) - t e r t - ブチル 4 - (2 - アミノアセトアミド) - 5 -

40

50

((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (0 . 5 g 、 0 . 4 8 1 m m o l) を加え、混合物を 2 5 で 2 . 5 時間攪拌した。9 回の同一の反応を実施し、合わせた。混合物を濃縮し、水中 1 M H B r (2 0 0 m L) 、水性 N a H C O ₃ (2 0 0 m L) 、ブライン (2 0 0 m L) で洗浄し、脱水し (N a ₂ S O ₄) 、濾過し、濃縮して、表題化合物を生成した (5 g 、 9 0 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 8) R t = 1 . 3 2 分、m / z 1 1 6 2 (M + H) ⁺。

10

【 0 3 0 0 】

ステップ 5 : (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 8 b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸の合成。ジクロロメタン (2 0 m L) 中 (S) - t e r t - ブチル 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタノエート (3 g 、 2 . 5 8 m m o l) に、トリフルオロ酢酸 (1 0 m L) を 2 5 で加え、混合物を 2 時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、分取 H P L C (方法 A A 2 0) で精製して、表題化合物を生成した (1 . 0 9 g 、 4 2 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 4) R t = 2 . 9 1 9 分、m / z 9 9 4 . 2 (M + H) ⁺。 ¹H NMR (メタノール - d₄ , 400 MHz) = 7.45 (b r d , J=7.9 Hz , 1H) , 7.40 - 7.29 (m , 4H) , 7.25 - 7.16 (m , 3H) , 6.9 5 (b r d , J=7.5 Hz , 1H) , 6.38 - 6.30 (m , 2H) , 5.66 - 5.57 (m , 1H) , 5.55 - 5.44 (m , 1H) , 5.08 - 4.94 (m , 2H) , 4.81 - 4.72 (m , 1H) , 4.49 (b r d d , J=5.0 , 9.0 Hz , 1H) , 4.32 (b r d , J=8.6 Hz , 1H) , 3.96 - 3.90 (m , 5H) , 2.79 - 2.60 (m , 1H) , 2.48 - 2.32 (m , 4H) , 2.28 (b r d , J=13.3 Hz , 1H) , 2.17 (d t , J=7.6 , 13.4 Hz , 1H) , 2.04 - 1.92 (m , 1H) , 1.85 - 1.72 (m , 3H) , 1.70 - 1.53 (m , 4H) , 1.01 (s , 3H) 。

20

30

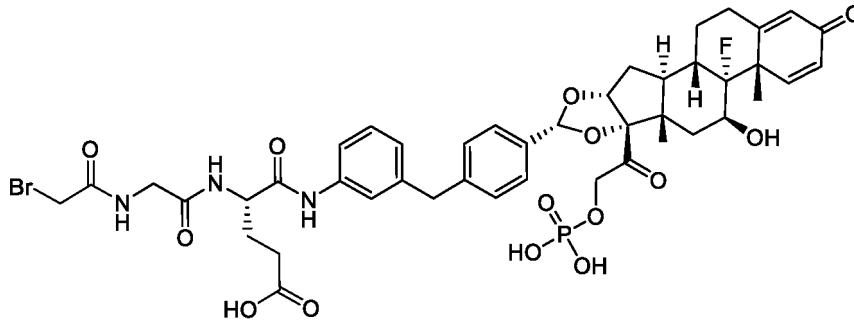
【 0 3 0 1 】

[前駆体実施例 3 6] (S) - 4 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 5 - ((3 - (4 - ((6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 8 b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸

40

【 0 3 0 2 】

【化 5 2】



10

【 0 3 0 3 】

2 - ((6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インドノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩を使用して、前駆体実施例 4 と類似の経路を使用して調製した。

L C M S (方法 A A 1 5) R t = 1 . 6 9 0 分、m / z 9 7 6 . 1 (M + H) ⁺。 ¹H N M R (メタノール-d₄ , 400 M H z) = 7.47 (br d, J=8.6 H z, 1H), 7.44 - 7.36 (m, 4H), 7.28 - 7.19 (m, 3H), 6.97 (d, J=7.6 H z, 1H), 6.33 (d, J=1.7, 10.1 H z, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 5.07 - 4.96 (m, 2H), 4.83 - 4.73 (m, 1H), 4.50 (dd, J=4.8, 9.0 H z, 1H), 4.34 (br d, J=8.7 H z, 1H), 4.00 - 3.91 (m, 6H), 2.83 - 2.71 (m, 1H), 2.68 - 2.54 (m, 1H), 2.45 (br t, J=7.6 H z, 3H), 2.40 - 2.26 (m, 2H), 2.25 - 2.13 (m, 1H), 2.06 - 1.91 (m, 2H), 1.84 - 1.72 (m, 3H), 1.65 - 1.50 (m, 4H), 1.04 (s, 3H).

20

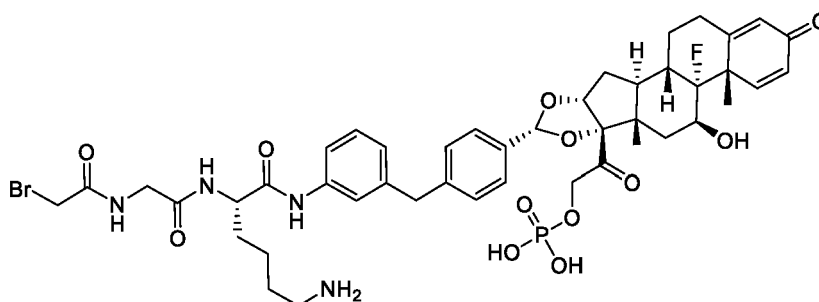
【 0 3 0 4 】

[前駆体実施例 3 7] 2 - ((6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - ((S) - 6 - アミノ - 2 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) ヘキサナアミド) ベンジル) フェニル) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インドノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩

30

【 0 3 0 5 】

【化 5 3】



40

【 0 3 0 6 】

2 - ((6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 6 b - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] イ

50

ンデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-8b-イル)-2-オキソエチルリン酸二水素塩を使用して、前駆体実施例5と類似の経路を使用して調製した。

L C M S (方法 A A 1 6) R t = 2 . 4 3 7 分、m / z 9 7 5 . 2 (M + H) ⁺。 ¹H N M R (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) = 9.94 (br s, 1H), 8.54 (br t, J=5.4 Hz, 1H), 8.21 (br d, J=7.9 Hz, 1H), 7.75 (br s, 3H), 7.51 (br d, J=7.3 Hz, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 3H), 7.30 - 7.17 (m, 4H), 6.95 (br d, J=7.5 Hz, 1H), 6.22 (br d, J=10.1 Hz, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 4.92 (br s, 1H), 4.79 (br dd, J=8.3, 18.2 Hz, 1H), 4.58 (br dd, J=8.0, 18.4 Hz, 1H), 4.42 - 4.32 (m, 1H), 4.19 (br d, J=9.0 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.89 (br s, 2H), 3.86 - 3.71 (m, 3H), 2.74 (br s, 2H), 2.33 (br s, 1H), 2.23 - 1.96 (m, 2H), 1.83 (br d, J=10.6 Hz, 2H), 1.76 - 1.46 (m, 10H), 1.45 - 1.22 (m, 3H), 0.90 (s, 3H)。

10

20

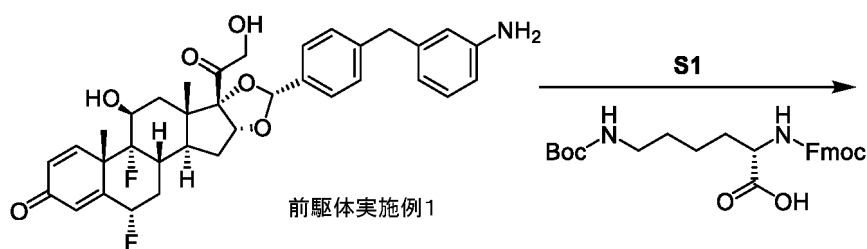
30

【0307】

[前駆体実施例47] (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-アミノ-1-((3-((4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-8b-(2-(ホスホノオキシ)アセチル)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-1-オキソヘキサン-2-イル)アミノ)-3-ヒドロキシ-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-4-(2-プロモアセトアミド)-5-オキソペンタン酸

【0308】

【化54】

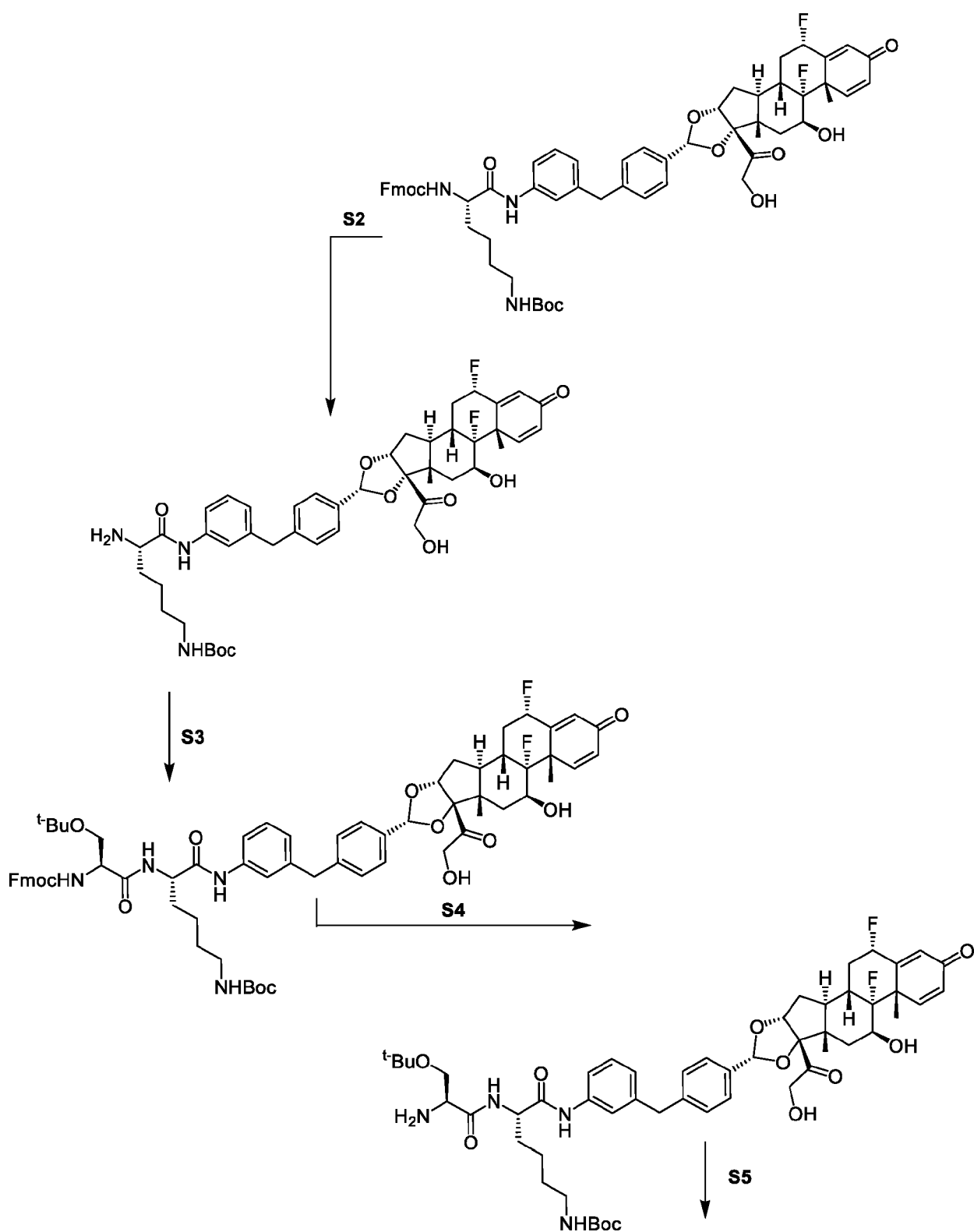


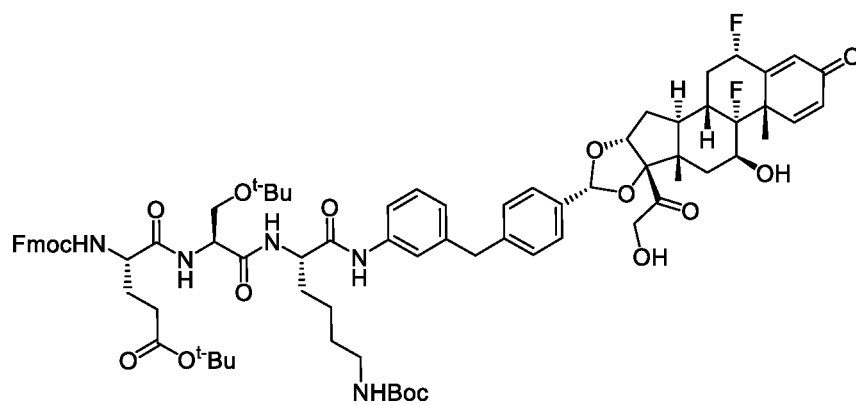
10

20

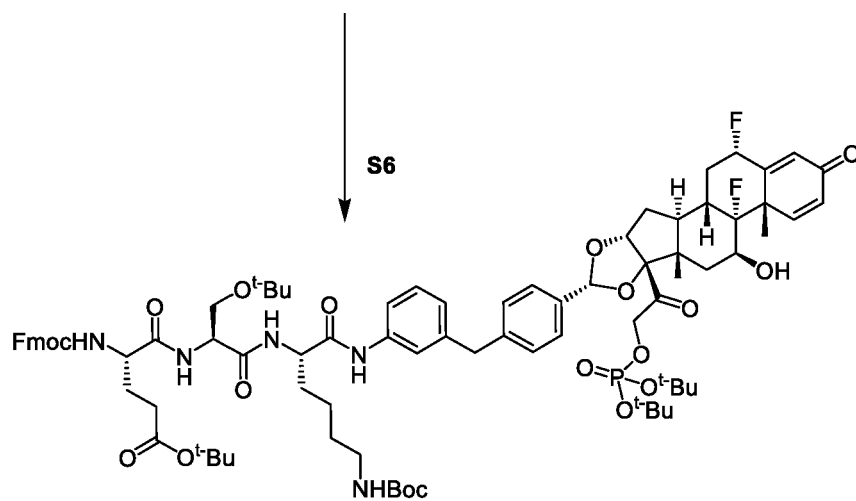
30

40

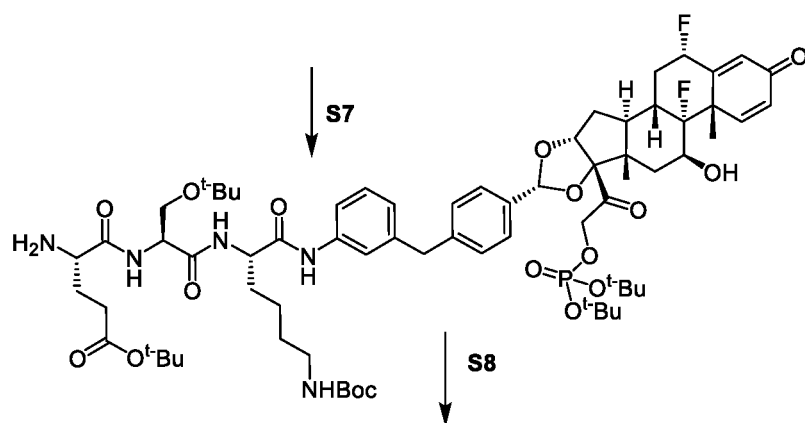




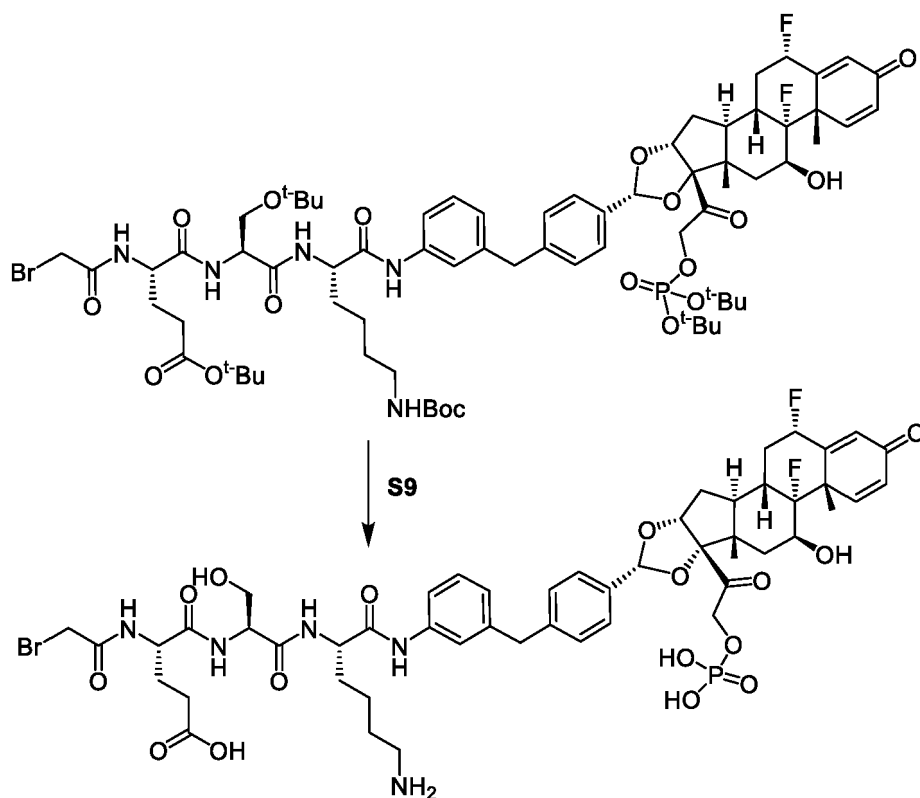
10



20



30



10

20

【0309】

ステップ1：(9H-フルオレン-9-イル)メチルtert-ブチル((S)-6-((3-(4-(2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-4-オキソ-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-10-イル)ベンジル)フェニル)アミノ)-6-オキソヘキサン-1,5-ジイル)ジカルバメートの合成。(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-6-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ヘキサン酸(0.390g、0.832mmol)、前駆体実施例1の生成物((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-アミノベンジル)フェニル)-2,6b-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-8b-(2-ヒドロキシアセチル)-6a,8a-ジメチル-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-ドデカヒドロ-1H-ナフト[2',1':4,5]インデノ[1,2-d][1,3]ジオキソール-4(2H)-オン)(0.504g、0.832mmol)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート(HATU)(0.380g、0.999mmol)及び2,6-ジメチルピリジン(0.291mL、2.496mmol)のジメチルホルムアミド(4mL)中の混合物を、周辺温度で30時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチル(100mL)で希釈し、HClの1N水溶液(50mL)、NaHCO₃飽和水溶液(50mL)及びブライン飽和溶液(50mL)で洗浄した。有機相を脱水し(Na₂SO₄)、濾過し、溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣を、0~70%酢酸エチル/ヘプタンの勾配で溶出するクロマトグラフィー(シリカ)で精製して、表題化合物を生成した(0.780g、89%収率)。LCMS(方法AA17):Rt=1.10分、m/z1056.9(M+H)⁺。¹H NMR(ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) 9.87(s, 1H), 7.85(d, J=7.5 Hz, 2H), 7.69(dd, J=7.6, 4.8 Hz, 2H), 7.52(d, J=7.9 Hz, 1H), 7.44(d, J=8.2 Hz, 1H)

30

40

50

), 7.41 - 7.24 (m, 7H), 7.24 - 7.12 (m, 4H), 6.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.24 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.61 (ddd, J = 48.9, 11.0, 6.6 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.06 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 19.4, 6.3 Hz, 1H), 4.27 - 4.11 (m, 4H), 4.07 - 3.95 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 2.89 - 2.83 (m, 2H), 2.66 - 2.51 (m, 1H), 2.28 - 2.23 (m, 2H), 2.20 (dt, J = 12.2, 6.3 Hz, 1H), 2.01 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 1.74 - 1.62 (m, 2H), 1.66 - 1.49 (m, 4H), 1.46 (s, 3H), 1.31 (s, 9H), 1.22 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 0.83 (s, 3H).

10

【0310】

ステップ2: tert - ブチル ((S) - 5 - アミノ - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキシル) カルバメートの合成。ジエチルアミン (0 . 540 g 、 7 . 39 mmol) を、 (9 H - フルオレン - 9 - イル) メチル tert - ブチル ((S) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキサン e - 1 , 5 - ジイル) ジカルバメート (0 . 780 g 、 0 . 739 mmol) のテトラヒドロフラン (10 mL) 中の脱気した溶液に加えた。反応混合物を周辺温度で2時間攪拌し、この時点で溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣をトルエン (3 x 50 mL) で処理し、これを減圧下で除去して、できるだけ多くのジエチルアミンを追い出した。粗製の表題化合物を、さらに精製せずに直ちに使用した。LCMS (方法 AA17) : Rt = 0 . 86 分、m / z 834 . 0 (M + H) ⁺。

20

30

【0311】

ステップ3: tert - ブチル ((S) - 5 - ((S) - 2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 3 - (tert - ブトキシ) プロパンアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキシル) カルバメートの合成。 (S) - 2 - (((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 3 - (tert - ブトキシ) プロパン酸 (0 . 283 g 、 0 . 739 mmol) 、 tert - ブチル ((S) - 5 - アミノ - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキシル) カルバメート (0 . 616 g 、 0 . 739 mmol) 、 1 - [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] - 1 H - 1 , 2 , 3 - トリアゾロ [4 , 5 - b] ピリジニウム 3 - オキシドヘキサフルオロホスフェート (HATU) (0 . 337 g 、 0 . 887 mmol) 及び 2 , 6 - ジメチルピリジン (

40

50

0.258 mL、2.217 mmol) のジメチルホルムアミド (4 mL) 中混合物を 0.5 時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチル (100 mL) で希釈し、HCl の 1 N 水溶液 (50 mL)、NaHCO₃ 飽和水溶液 (50 mL) 及びブライン飽和溶液 (50 mL) で洗浄した。有機相を脱水し (Na₂SO₄)、濾過し、溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣を、0 ~ 70 % 酢酸エチル / ヘプタンの勾配で溶出するクロマトグラフィー (シリカ) で精製して、表題化合物を生成した (0.500 g、56 % 収率)。LCMS (方法 AA17) : Rt = 1.18 分、m/z 1199.2 (M+H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 500 MHz) 9.84 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.70 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.46 - 7.26 (m, 7H), 7.26 - 7.13 (m, 5H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.27 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.62 (dt, J = 48.6, 9.1 Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.08 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 19.4, 5.8 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.33 - 4.07 (m, 5H), 3.84 (s, 2H), 3.44 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.85 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.68 - 2.53 (m, 1H), 2.32 - 2.16 (m, 2H), 2.02 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 1.67 (d, J = 13.5 Hz, 3H), 1.60 - 1.48 (m, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.31 (s, 10H), 1.25 - 1.16 (m, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.84 (s, 3H).

10

20

【0312】

ステップ 4 : tert - ブチル ((S) - 5 - ((S) - 2 - アミノ - 3 - (tert - ブトキシ) プロパンアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1' : 4, 5] インデノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキシル) カルバメートの合成。ジエチルアミン (0.305 g、4.17 mmol) を、tert - ブチル ((S) - 5 - ((S) - 2 - (((9H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 3 - (tert - ブトキシ) プロパンアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1' : 4, 5] インデノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキシル) カルバメート (0.500 g、0.417 mmol) のテトラヒドロフラン (10 mL) 中の脱気した溶液に加えた。反応混合物を周辺温度で 2 時間撹拌し、この時点で溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣をトルエン (3 x 50 mL) で処理し、これを減圧下で除去して、できるだけ多くのジエチルアミンを排除した。粗製の表題化合物をさらに精製せずに直ちに使用した。LCMS (方法 AA17) : Rt = 0.92 分、m/z 976.9 (M+H)⁺。

30

40

【0313】

ステップ 5 : (10S, 13S, 16S) - tert - ブチル 16 - ((((9H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 13 - (tert - ブトキシメチル) - 10 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト [2', 1' : 4, 5] インデノ [1, 2 - d] [1, 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 12, 15 - トリオキソ -

50

3 - オキサ - 5 , 1 1 , 1 4 - トリアザノナデカン - 1 9 - オエートの合成。(S) - 2 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 5 - (t e r t - ブトキシ) - 5 - オキソペンタン酸 (0 . 1 7 7 g 、 0 . 4 1 7 m m o l) 、 t e r t - ブチル ((S) - 5 - ((S) - 2 - アミノ - 3 - (t e r t - ブトキシ) プロパンアミド) - 6 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 6 - オキソヘキシル) カルバメート (0 . 4 0 7 g 、 0 . 4 1 7 m m o l) 、 (1 - [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] - 1 H - 1 , 2 , 3 - トリアゾロ [4 , 5 - b] ピリジニウム 3 - オキシドヘキサフルオロホスフェート) (H A T U) (0 . 1 9 0 g 、 0 . 5 0 0 m m o l) 及び 2 , 6 - ジメチルピリジン (0 . 1 4 6 m l 、 1 . 2 5 1 m m o l) のジメチルホルムアミド (4 m l) 中混合物を 0 で 0 . 5 時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル (1 0 0 m l) で希釈し、H C l の 1 M 水溶液 (5 0 m l) 、 N a H C O ₃ 飽和水溶液 (5 0 m l) 及びブライン飽和溶液 (5 0 m l) で洗浄した。有機相を脱水し (N a ₂ S O ₄) 、濾過し、溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣を、0 ~ 7 0 % 酢酸エチル / ヘプタンの勾配で溶出するクロマトグラフィー (シリカ) で精製して、表題化合物を生成した (0 . 4 5 5 g 、 7 9 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 7) : R t = 1 . 0 3 分、m / z は観察されなかった。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 500 MHz) 9.77 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.68 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 - 7.34 (m, 4H), 7.34 - 7.22 (m, 4H), 7.16 (dd, J = 22.5, 8.0 Hz, 3H), 6.87 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.25 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.70 - 5.50 (m, 1H), 5.48 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.06 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 19.4, 6.2 Hz, 1H), 4.29 (dt, J = 19.5, 6.5 Hz, 3H), 4.23 - 4.10 (m, 3H), 4.03 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.53 (s, 0H), 3.52 - 3.36 (m, 1H), 2.84 - 2.78 (m, 2H), 2.67 - 2.50 (m, 1H), 2.22 (t, J = 8.4 Hz, 3H), 2.01 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 1.88 (s, 1H), 1.80 - 1.58 (m, 6H), 1.56 - 1.48 (m, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.29 (s, 9H), 1.20 (s, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.93 (s, 1H), 0.82 (s, 3H) .

【 0 3 1 4 】

ステップ 6 : (1 0 S , 1 3 S , 1 6 S) - t e r t - ブチル 1 6 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 1 3 - (t e r t - ブトキシメチル) - 1 0 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - t e r t - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2 , 2 - ジメチル - 4 , 1 2 , 1 5 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5 , 1 1 , 1 4 - トリアザノナデカン - 1 9 - オエートの合成。(1 0 S , 1 3 S , 1 6 S) - t e r t - ブチル 1 6 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 1 3 - (t e r t - ブトキシメチル) - 1 0 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1

H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2 , 2 - ジメチル - 4 , 12 , 15 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5 , 11 , 14 - トリアザノナデカン - 19 - オエート (0 . 452 g、0 . 326 mmol) 及び 1 H - テトラゾール (0 . 105 g、1 . 502 mmol) のジメチルホルムアミド (1 . 5 mL) 中混合物をジ - tert - ブチルジエチルホスホラミダイト (0 . 291 mL、1 . 045 mmol) で処理した。反応混合物を周辺温度に対して 4 時間攪拌し、この時点で H_2O_2 (50 重量%、0 . 3 mL) の水溶液を加え、攪拌を 1 時間継続した。アセトニトリル及び 10 mM 水性酢酸アンモニウムの勾配で溶出する分取 HPLC の精製により、表題化合物が生成した (0 . 455 g、79 % 収率)。LCMS (方法 A A 17) : Rt = 1 . 35 分、m/z 1575 . 8 (M + H)⁺。 ¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d6, 400 MHz) 9.76 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.7 Hz, 3H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 - 7.18 (m, 10H), 7.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.25 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.70 - 5.48 (m, 3H), 4.98 - 4.87 (m, 2H), 4.61 (dd, J = 17.9, 9.3 Hz, 1H), 4.29 (dt, J = 19.4, 6.8 Hz, 2H), 4.19 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.03 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.54 - 3.32 (m, 1H), 2.82 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 2.74 - 2.50 (m, 1H), 2.22 (t, J = 7.9 Hz, 3H), 2.03 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 1.94 - 1.80 (m, 1H), 1.76 - 1.60 (m, 5H), 1.55 - 1.41 (m, 2H), 1.45 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 1.34 (s, 9H), 1.29 (s, 9H), 1.25 - 1.12 (m, 1H), 0.99 (s, 9H), 0.91 (s, 1H), 0.85 (s, 3H)。

【 0 3 1 5 】

ステップ 7 : (10 S , 13 S , 16 S) - tert - ブチル 16 - アミノ - 13 - (tert - ブトキシメチル) - 10 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2 , 2 - ジメチル - 4 , 12 , 15 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5 , 11 , 14 - トリアザノナデカン - 19 - オエートの合成。ジエチルアミン (0 . 100 g、1 . 364 mmol) を、(10 S , 13 S , 16 S) - tert - ブチル 16 - ((((9 H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 13 - (tert - ブトキシメチル) - 10 - ((3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 10 R , 11 a R , 12 a S , 12 b S) - 8 b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 11 a , 12 , 12 a , 12 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2 , 2 - ジメチル - 4 , 12 , 15 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5 , 11 , 14 - トリアザノナデカン - 19 - オエート (0 . 215 g、0 . 136 mmol) の THF (8 mL) 中脱気した溶液に加えた。反応混合物を周辺温度で 2 時間攪拌し、この時点で溶媒を減圧下で除去した。生成した残渣をトルエン (3 × 50 mL) で処理し、これを減圧下で除去して、できるだけ多くのジエチルアミンを追い出した。粗製の表題化合物をさらに精製せずに直ちに使用した。LCMS (方法 A A 17) : Rt = 1 . 11 分、m/z 1354 . 8 (M + H)⁺。

【 0 3 1 6 】

ステップ 8 : (10 S , 13 S , 16 S) - tert - ブチル 16 - (2 - プロモアセ

トアミド) - 13 - (tert - ブトキシメチル) - 10 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 12, 15 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5, 11, 14 - トリアザノナデカン - 19 - オエートの合成。プロモ酢酸(0.0347g、0.250mmol)及びエチル2 - エトキシキノリン - 1(2H) - カルボキシレート(0.07736g、0.298mmol)のジメチルホルムアミド(0.2mL)中混合物を周辺温度で30分間攪拌し、この時点で(10S, 13S, 16S) - tert - ブチル16 - アミノ - 13 - (tert - ブトキシメチル) - 10 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 12, 15 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5, 11, 14 - トリアザノナデカン - 19 - オエート(0.130g、0.096mmol)のジメチルホルムアミド(0.3mL)中溶液を
 プロモ酢酸溶液に加えた。反応物を周辺温度で20分間攪拌した。アセトニトリル及び水中0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸の勾配で溶出する分取HPLCでの精製により、表題化合物を生成した(0.103g、73%収率)。LCMS(方法AA17): Rt = 1.20分、m/z 1474.4、1476.5(M+H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 400 MHz) 9.77 (s, 1H), 8.46 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (dd, J = 14.0, 9.0 Hz, 3H), 7.15 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.26 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.58 (d, J = 51.4 Hz, 3H), 4.98 - 4.87 (m, 2H), 4.61 (dd, J = 18.0, 9.2 Hz, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.17 (s, 1H), 3.93 - 3.86 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.63 (s, 10H), 2.87 - 2.79 (m, 2H), 2.28 - 2.16 (m, 4H), 2.04 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 1.87 (s, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.63 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 1.33 (s, 9H), 1.30 (s, 9H), 1.19 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 1.02 (s, 9H), 0.85 (s, 3H).

10

20

30

【0317】

ステップ9: (S) - 5 - ((S) - 1 - ((S) - 6 - アミノ - 1 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a - ジメチル - 4 - オキソ - 8b - (2 - (ホスホノオキシ) アセチル) - 2, 4, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 8b, 11a, 12, 12a, 12b - ドデカヒドロ - 1H - ナフト[2', 1': 4, 5]インデノ[1, 2-d][1, 3]ジオキソール - 10 - イル) ベンジル) フェニル) アミノ) - 1 - オキソヘキサン - 2 - イル) アミノ) - 3 - ヒドロキシ - 1 - オキソプロパン - 2 - イル) アミノ) - 4 - (2 - プロモアセトアミド) - 5 - オキソペンタン酸の合成。トリフルオロ酢酸(2mL、0.068mmol)を、(10S, 13S, 16S) - tert - ブチル16 - (2 - プロモアセトアミド) - 13 - (tert - ブトキシメチル) - 10 - ((3 - (4 - ((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS) - 8b - (2 - ((ジ - tert - ブトキシホスホリル) オキシ) アセチル) - 2, 6b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 6a, 8a -

40

50

ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) カルバモイル) - 2 , 2 - ジメチル - 4 , 1 2 , 1 5 - トリオキソ - 3 - オキサ - 5 , 1 1 , 1 4 - トリアザノナデカン - 1 9 - オエート (0 . 1 0 0 g 、 0 . 0 6 8 m m o l) のジクロロメタン (2 m L) 中 0 溶液に加えた。反応物を 0 で 1 0 分間攪拌し、この時点で氷浴を除去し、攪拌を周辺温度で追加の 9 0 分間継続した。アセトニトリル及び水中 0 . 1 % (v / v) トリフルオロ酢酸の勾配で溶出する分取 H P L C での精製により、表題化合物を生成した (0 . 0 5 6 g 、 7 2 % 収率) 。 L C M S (方法 A A 1 7) 主要アセタール異性体 : R t = 0 . 7 5 分、m / z 1 1 4 9 . 7 、 1 1 5 1 . 8 (M + H) ⁺ ; 微量のアセタール異性体 R t = 0 . 7 8 分、m / z 1 1 4 9 . 7 、 1 1 5 1 . 7 (M + H) ⁺ 。 ¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 500 MHz) 9.70 (s, 1H), 8.61 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.81 (s, 3H), 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.23 (t, J = 8.7 Hz, 3H), 7.18 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.97 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.77 - 5.53 (m, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.92 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 4.70 (dd, J = 19.0, 8.1 Hz, 1H), 4.53 (dd, J = 19.0, 7.9 Hz, 1H), 4.27 (q, J = 6.6 Hz, 3H), 4.19 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.96 - 3.86 (m, 4H), 3.58 (qd, J = 10.9, 5.9 Hz, 2H), 2.77 - 2.52 (m, 3H), 2.68 - 2.54 (m, 0H), 2.49 (s, 2H), 2.23 (q, J = 8.3 Hz, 3H), 2.00 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 1.93 - 1.85 (m, 2H), 1.77 - 1.69 (m, 1H), 1.72 - 1.65 (m, 3H), 1.57 (s, 1H), 1.49 (s, 4H), 1.54 - 1.44 (m, 2H), 1.30 (s, 2H), 0.88 (s, 3H) .

10

20

30

40

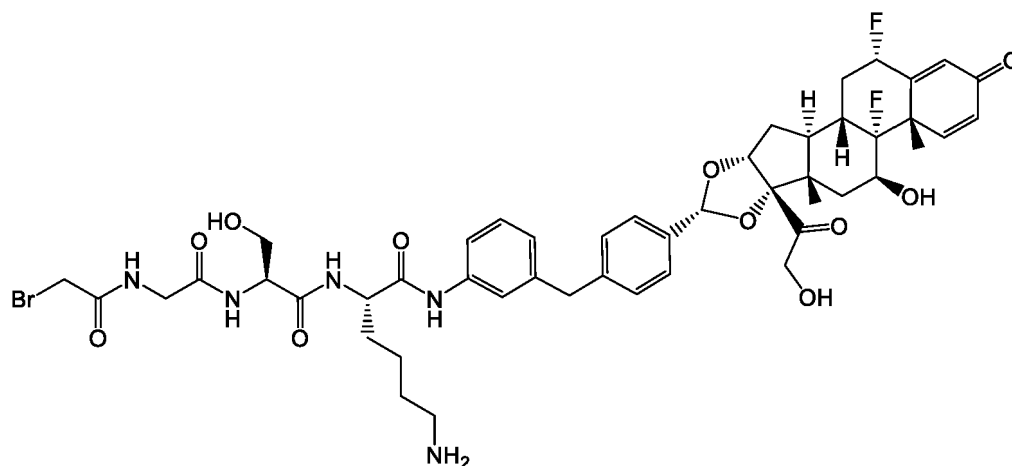
50

【 0 3 1 8 】

[前駆体実施例 4 8] (S) - 6 - アミノ - 2 - ((S) - 2 - (2 - (2 - プロモアセトアミド) アセトアミド) - 3 - ヒドロキシプロパンアミド) - N - (3 - (4 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 2 , 6 b - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシ - 8 b - (2 - ヒドロキシアセチル) - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 8 b , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 1 H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 1 0 - イル) ベンジル) フェニル) ヘキサナムド

【 0 3 1 9 】

【 化 5 5 】



【 0 3 2 0 】

2 - ((2 S , 6 a S , 6 b R , 7 S , 8 a S , 8 b S , 1 0 R , 1 1 a R , 1 2 a S , 1 2 b S) - 1 0 - (4 - (3 - アミノベンジル) フェニル) - 2 , 6 b - ジフルオロ

- 7 - ヒドロキシ - 6 a , 8 a - ジメチル - 4 - オキソ - 1 , 2 , 4 , 6 a , 6 b , 7 , 8 , 8 a , 1 1 a , 1 2 , 1 2 a , 1 2 b - ドデカヒドロ - 8 b H - ナフト [2 ' , 1 ' : 4 , 5] インデノ [1 , 2 - d] [1 , 3] ジオキソール - 8 b - イル) - 2 - オキソエチルリン酸二水素塩を使用して、前駆体実施例 4 7 と類似の経路を使用して調製した。LCMS (方法 A A 1 7) Rt = 0 . 7 9 分、m / z 9 9 8 . 7、1 0 0 0 . 9 (M + H)⁺。¹H NMR (ジメチルスルホキシド-d₆, 500 MHz) 9.66 (s, 1H), 8.55 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 12.8, 7.7 Hz, 2H), 7.62 (s, 3H), 7.48 - 7.40 (m, 2H), 7.40 - 7.32 (m, 2H), 7.31 - 7.23 (m, 3H), 7.23 - 7.17 (m, 2H), 6.92 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.30 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.66 (dt, J = 48.7, 10.2 Hz, 1H), 5.54 (dd, J = 4.5, 1.7 Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.95 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 4.36 (td, J = 12.8, 7.2 Hz, 2H), 4.20 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 3.89 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.82 (qd, J = 16.7, 5.7 Hz, 2H), 3.65 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 10.5, 5.9 Hz, 1H), 2.78 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.73 - 2.58 (m, 1H), 2.35 - 2.28 (m, 1H), 2.24 (td, J = 12.3, 6.8 Hz, 1H), 2.04 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 1.85 - 1.50 (m, 4H), 1.50 (s, 3H), 1.36 (dq, J = 16.0, 8.3 Hz, 2H), 0.87 (s, 3H).

10

20

30

40

50

【 0 3 2 1 】

[A D C 実施例 1] マレイミド由来生成物とのコンジュゲーション (一般的方法)

1 . マレイミドとのシステインコンジュゲーションプロトコル

抗体の約 1 0 m g / m L 溶液を、リン酸緩衝液生理食塩水 (P B S)、p H 7 . 4 並びに P B S (P i e r c e B o n d - B r e a k e r、c a t . 7 7 7 2 0) 中の 1 0 m M T C E P (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン) 溶液中に調製した。次いで、抗 C D 4 0 抗体 (表 3) をおよそ 2 モル当量 (e q) の 1 0 m M T C E P を添加することにより部分的に還元し、素早く混合し、3 7 ° で 6 0 分間インキュベートした。次いで、ジメチルスルホキシド (D M S O) を、全 D M S O 1 5 % になるまでの十分な量で部分的に還元された抗体に加えた。次いで、コンジュゲーションのため、8 モル当量 (e q) の実施例 6 ~ 1 3 のマレイミド生成物 (P B S 中 1 0 m M) を加え、部分的に還元された抗体と共に室温で 3 0 分間インキュベートした。次いで、事前にリン酸緩衝液生理食塩水緩衝液、p H 7 . 4 で平衡化しておいた N A P - 5 脱塩カラム (G E H e a l t h c a r e、c a t . 1 7 - 0 8 5 3 - 0 2) を使用して過剰のマレイミド生成物及び D M S O を除去した。次いで、脱塩した試料をサイズ排除クロマトグラフィー (S E C)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)、及び換算質量分析法で分析した。

【 0 3 2 2 】

2 . チオスクシンイミド加水分解

A D C のチオスクシンイミド環の加水分解を、高い p H で A D C をインキュベートすることにより達成した。簡単に説明すると、0 . 7 M アルギニン、p H 9 . 0 溶液を調製し、リン酸緩衝液生理食塩水 (P B S) 緩衝液中の各 A D C に加えて、全アルギニン濃度を 5 0 m M (p H 約 8 . 9) にした。次いで、材料を 2 5 ° で 7 2 時間インキュベートした。次いで、換算質量分析法によりスクシンイミド環の加水分解を確認し、この後、0 . 1 M 酢酸溶液を全酢酸 1 2 . 5 m M (p H 約 7 . 1) まで添加することにより、加水分解をクエンチした。

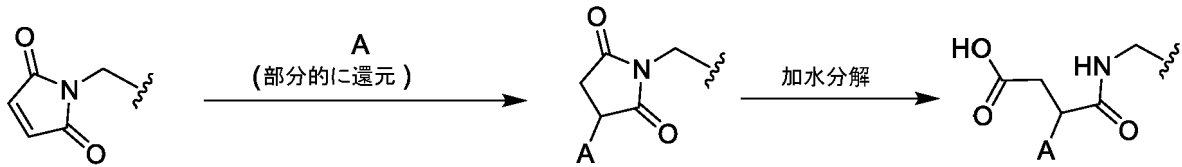
【 0 3 2 3 】

表 1 1 は、この一般的方法に従い合成した A D C コンジュゲートを提供している (例示的な数の A D C コンジュゲートに対して凝集データが提供された)。表 1 2 は、この一般的方法に従い合成することができる A D C コンジュゲートを提供している。変数 (A) は抗 C D 4 0 抗体に対応している ; n = 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 1 0 である。ヒト抗 C D 4 0 抗体は A b 1 0 2 (表 3) に対応している。マウス抗 C D 4 0 抗体

は、参照により本明細書に組み込まれるUS 20160347850に記載の抗体138に対応している。P = 前駆体実施例である。抗体138は、Ab 102と類似の特徴を有し、例えば、抗体138はAb 102のような実質的なアゴニスト活性の無いアンタゴニスト抗体である。よって、抗体138はマウスモデルにおけるAb 102活性の代表的なものである。

【0324】

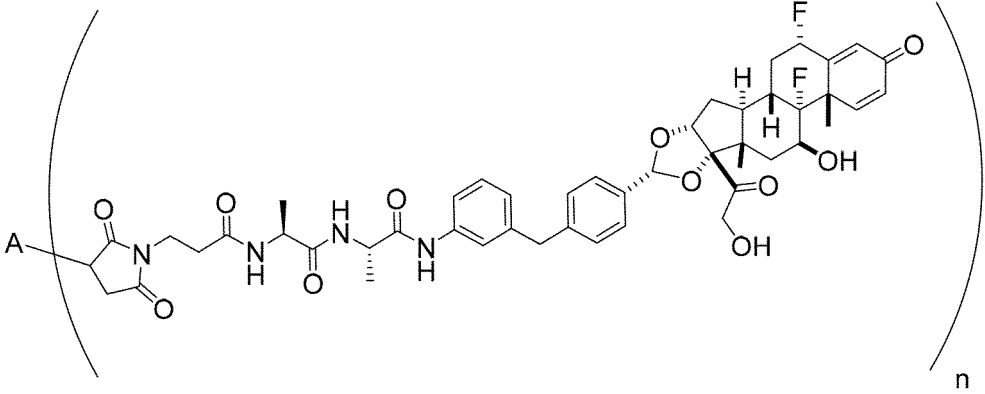
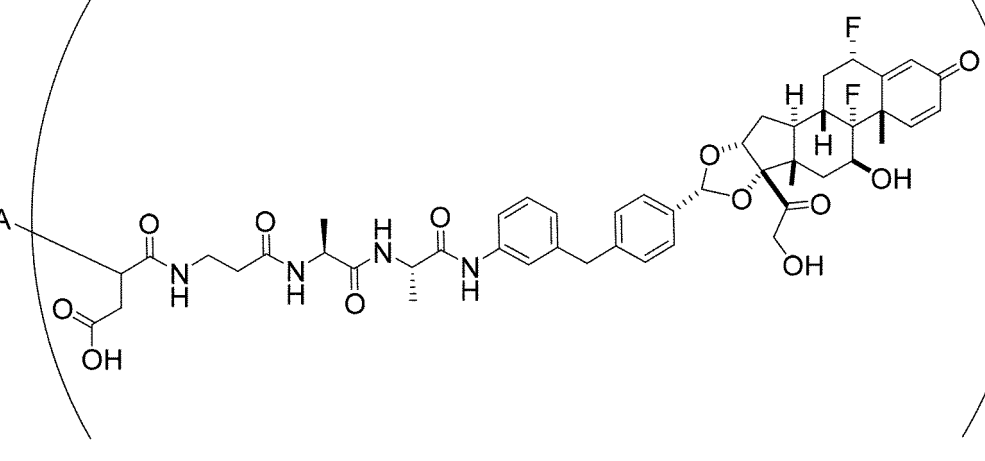
【化56】



10

【0325】

【表 10】

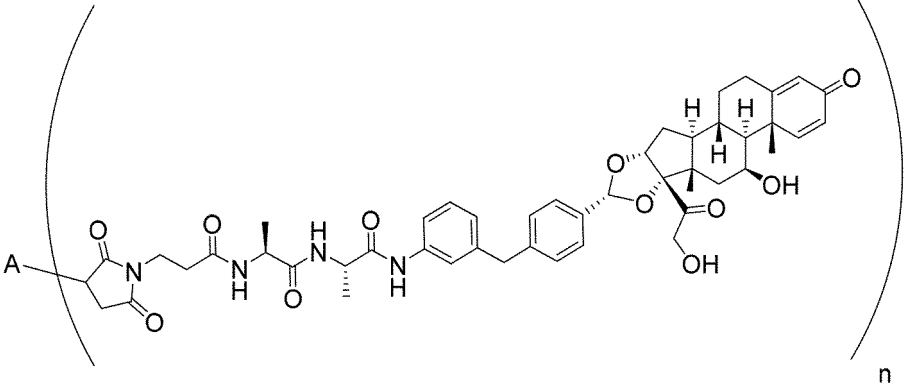
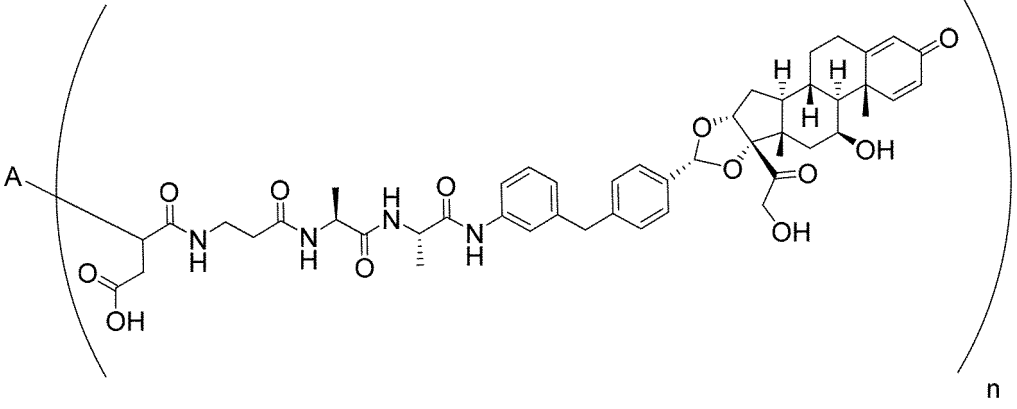
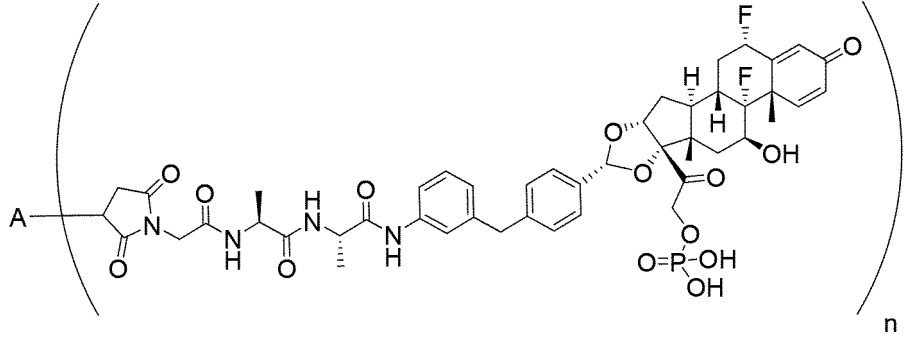
P	ADC 生成物	n
6	 <p style="text-align: center;">実施例 6-コンジュゲート型(マウス)</p>	4
6	 <p style="text-align: center;">実施例 6-加水分解型(マウス) 凝集(%)=0.6</p>	4

10

20

30

表 11. 合成したマレイミド由来の ADC

P	ADC 生成物	n
7	 <p>実施例 7-コンジュゲート型(マウス)</p>	4
7	 <p>実施例 7-加水分解型(マウス) 凝集(%)=0</p>	4
12	 <p>実施例 12-コンジュゲート型(マウス)</p>	2

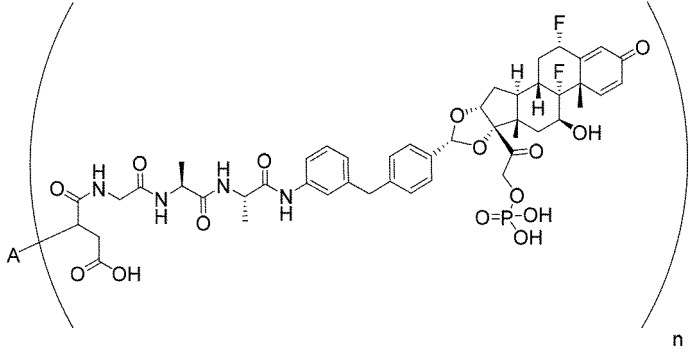
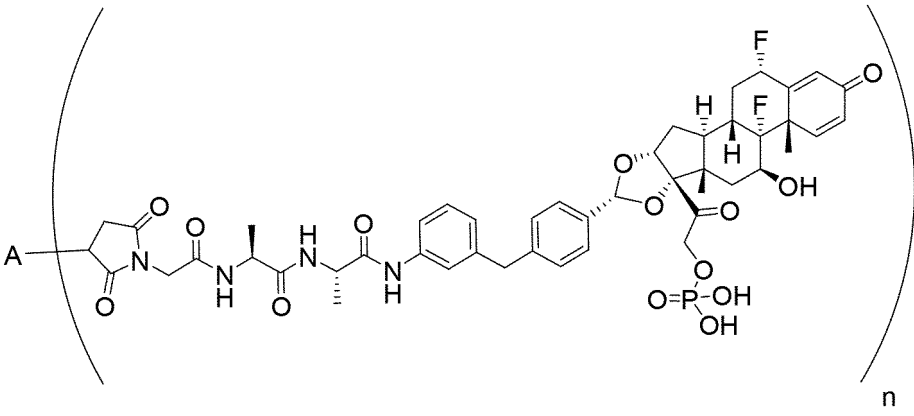
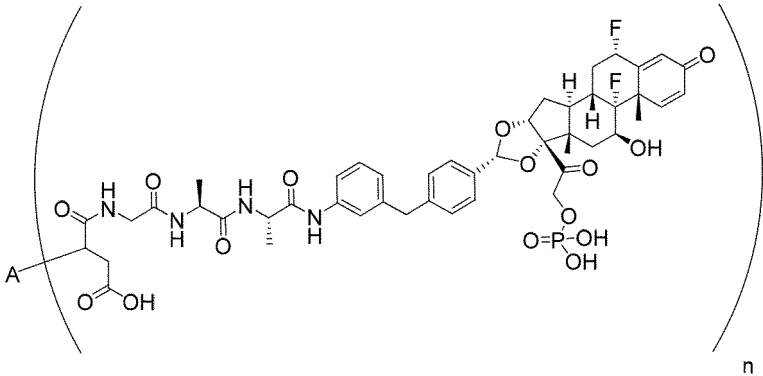
10

20

30

40

表 11. 合成したマレイミド由来の ADC

P	ADC 生成物	n
12	 <p>実施例 12-加水分解型(マウス)</p> <p>$n=2$, 凝集(%)=1.5; $n=4$, 凝集(%)=0</p>	2 4
12	 <p>実施例 12-コンジュゲート型(ヒト)</p>	4
12	 <p>実施例 12-加水分解型(ヒト)</p>	4

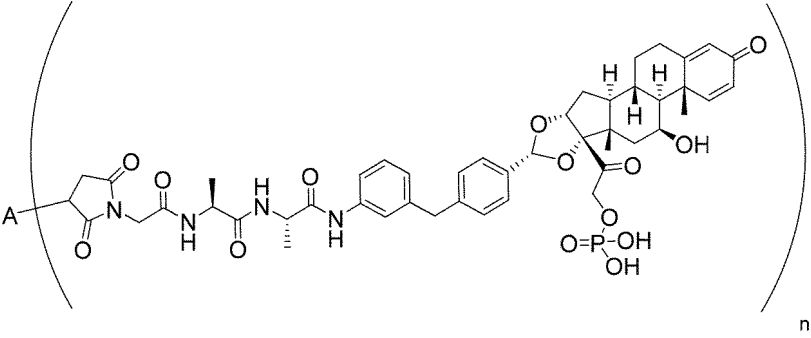
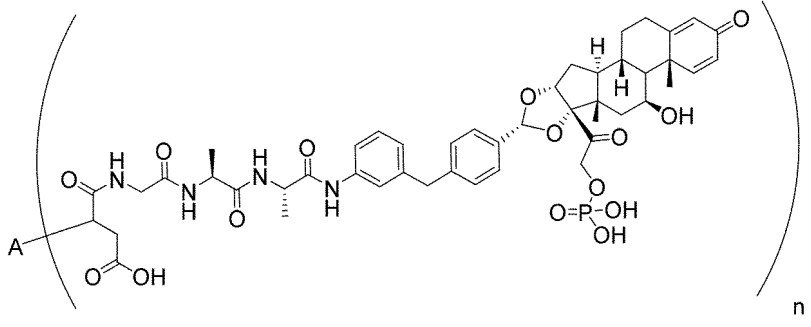
10

20

30

40

表 11. 合成したマレイミド由来の ADC

P	ADC 生成物	n
13	 <p data-bbox="574 689 997 728">実施例 13-コンジュゲート型(ヒト)</p>	4
13	 <p data-bbox="614 1160 957 1198">実施例 13-加水分解型(ヒト)</p>	4

10

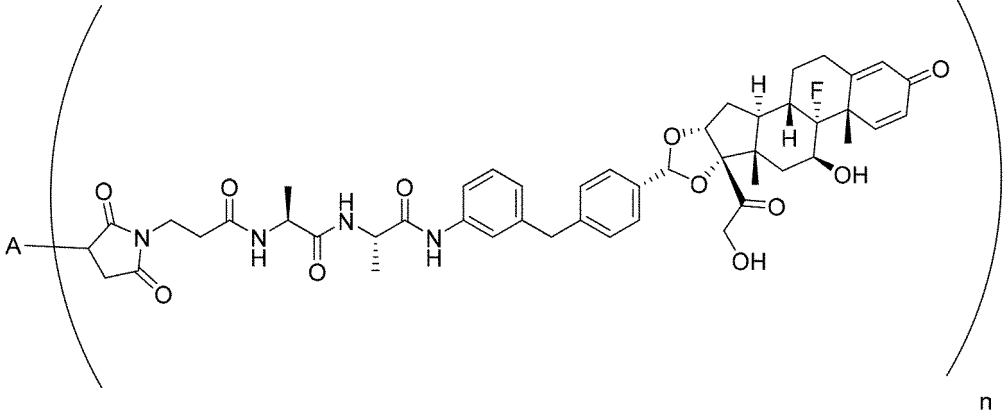
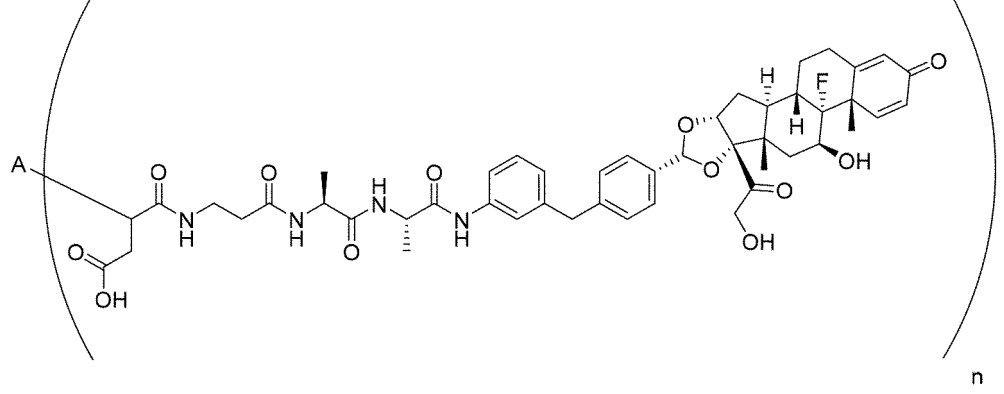
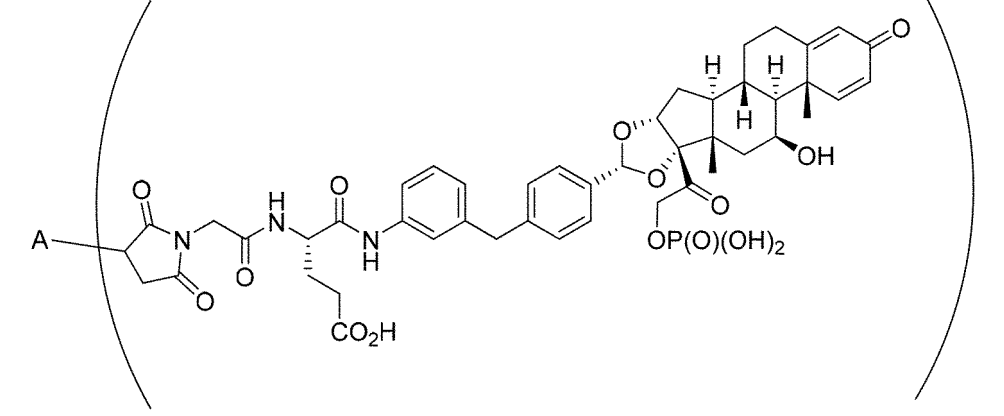
20

【 0 3 2 6 】

30

【表 1 1】

表 12. 追加のマレイミド由来の ADC

P	ADC 生成物
8	 <p style="text-align: center;">実施例 8-コンジュゲート型</p>
8	 <p style="text-align: center;">実施例 8-加水分解型</p>
9	 <p style="text-align: center;">実施例 9-コンジュゲート型</p>

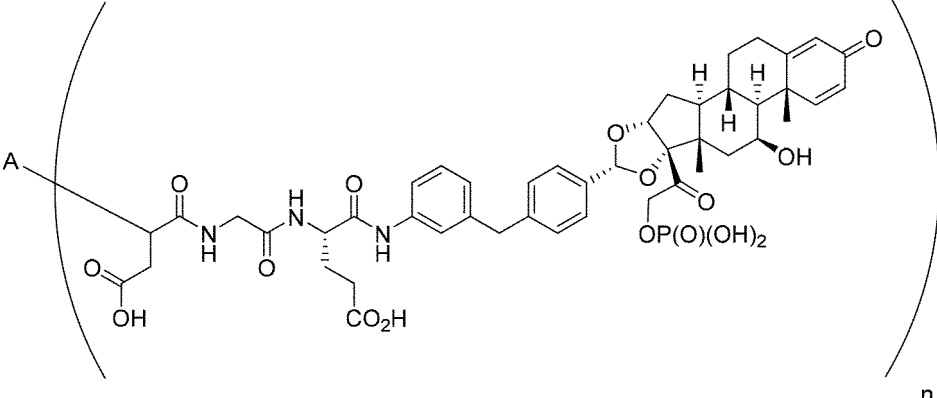
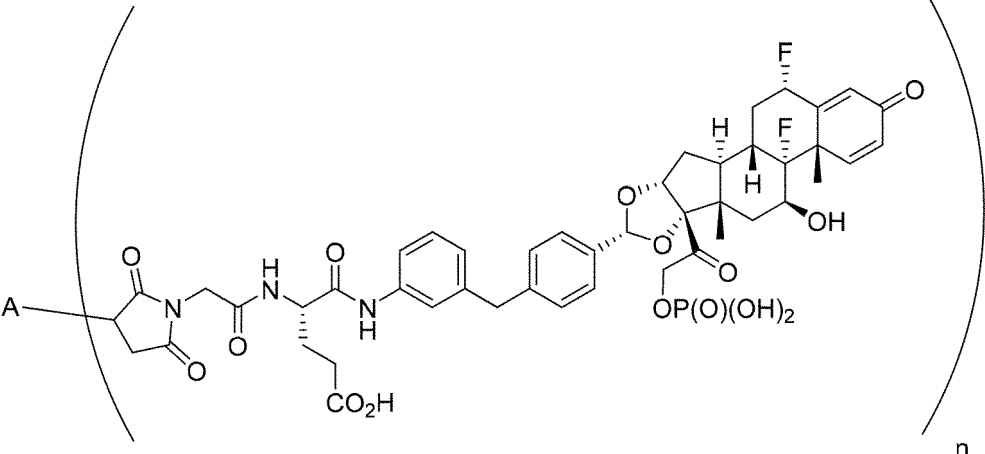
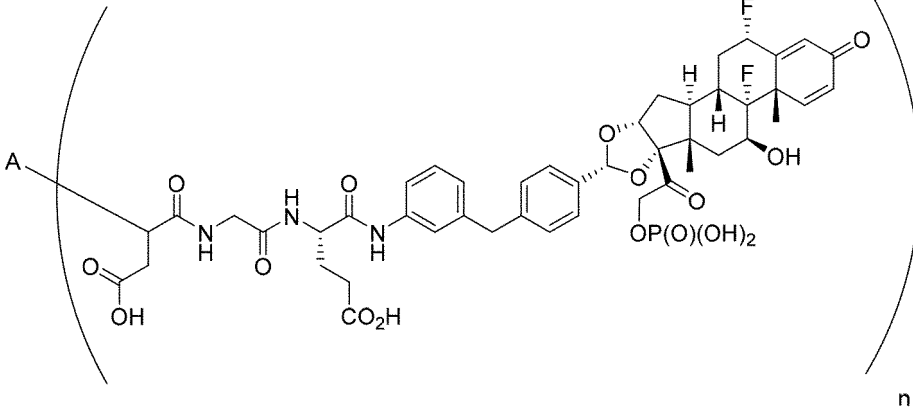
10

20

30

40

表 12. 追加のマレイミド由来の ADC

P	ADC 生成物
9	 <p style="text-align: center;">実施例 9-加水分解型</p>
10	 <p style="text-align: center;">実施例 10-コンジュゲート型</p>
10	 <p style="text-align: center;">実施例 10-加水分解型</p>

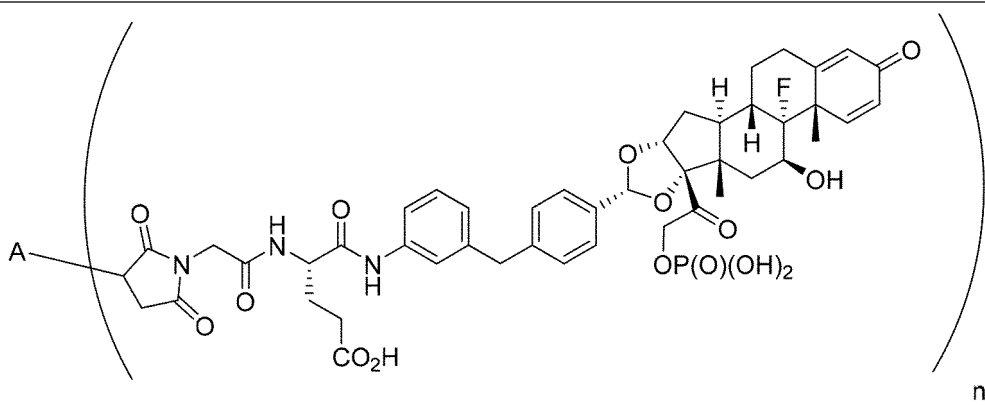
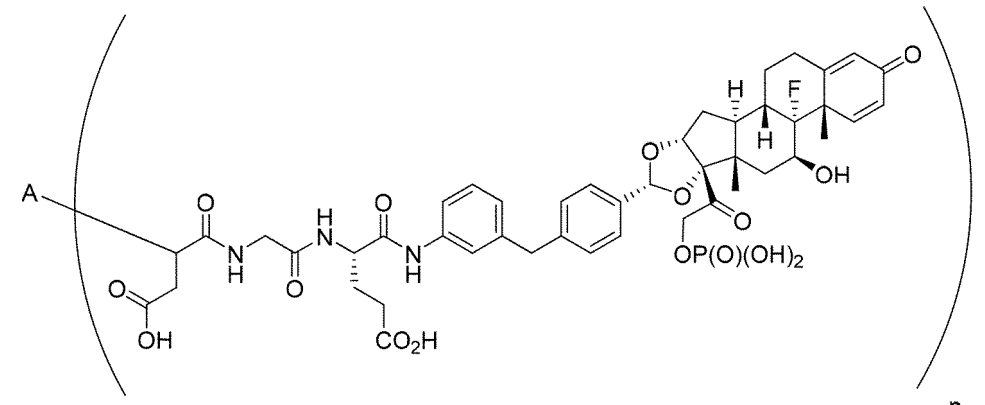
10

20

30

40

表 12. 追加のマレイミド由来の ADC

P	ADC 生成物
11	 <p>実施例 11-コンジュゲート型</p>
11	 <p>実施例 11-加水分解型</p>

10

20

30

40

【 0 3 2 7 】

[A D V 実施例 2] 前駆体プロモアセトアミド生成物とのコンジュゲーション（一般的方法）

1. 一般的手順

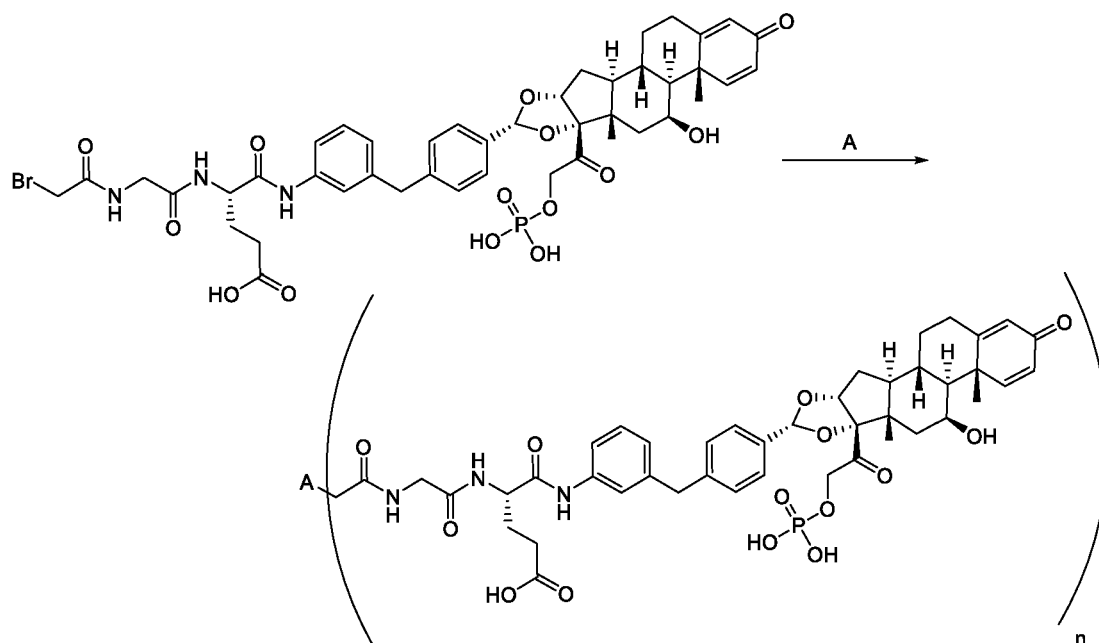
所望の抗体の約 5 ~ 20 mg / mL 溶液をリン酸緩衝液生理食塩水（P B S）、p H 6 ~ 7.4 中に調製した。選択した還元剤、例えば、T C E P（トリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィン）などを希釈するか、又は H₂ O、ジメチルスルホキシド（D M S O）、ジメチルアセトアミド（D M A）若しくはジメチルホルムアミド（D M F）などの溶媒に溶解して、1 ~ 25 m M の間の濃度範囲の溶液を得た。次いで、抗 C D 4 0 抗体を、約 2 ~ 3.5 当量の還元剤の添加により部分的に還元し、素早く混合し、0 ~ 4 で終夜インキュベートした。次いで、トリス緩衝液、p H 8 ~ 8.5（20 ~ 50 m M）を加え、これに続いてジメチルスルホキシド（D M S O）又はジメチルアセトアミド（D M A）（全部で 15 % 未満）中の実施例 4 ~ 5 のプロモアセトアミド生成物を加え、混合物を室温で 2 ~ 3 時間インキュベートした。次いで、過剰のプロモアセトアミド生成物及び有機溶媒を精製で除去した。次いで、精製した A D C 試料をサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（H I C）及び換算質量分析法で分析した。

【 0 3 2 8 】

2. 前駆体実施例 4 のヒト A D C の調製

【 0 3 2 9 】

【化 5 7】



10

【0330】

20

濃度 20 mg/mL の 100 mg のヒト抗 CD40 抗体 (Ab102、表3) を、ジフェニルホスフィノ酢酸 (2.9 ~ 3.0 当量 (eq)) で、0 で終夜還元した。次いで、部分的に還元された CD40 Ab を、室温で3時間、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で実施例4プロモアセトアミド生成物 (10 当量 (eq)) にコンジュゲートした。複数の NAP25 脱塩カラムを使用して、コンジュゲーション混合物を、最初に 20 mM トリス緩衝液、 50 mM NaCl、 $\text{pH} 7.8$ へと緩衝液交換をした。脱塩した ADC 溶液を、AEC で精製して、ADC の DAR2 ($n=2$) 及び DAR4 ($n=4$) 構成成分を生成した (薬物連結した分子の数は還元された鎖間ジスルフィド結合の数に依存する)。

【0331】

30

AEC 条件

以下の AEC 条件を使用した：カラムは Propac (商標) WAX-10、 $4 \times 250 \text{ mm}$ (Thermo Fisher Scientific、cat. 054999) であり、カラム温度は 37°C であった。波長は 280 nm であり、作動時間は18分であり、注入量は $20 \mu\text{g}$ であり、流量は 1.0 mL/分 であった。移動相 A： 20 mM MES、 $\text{pH} 6.7$ 、移動相 B： 20 mM MES、 500 mM NaCl、 $\text{pH} 6.7$ 。DAR2 ADC は、凝集 0% で保持時間 7.70 分を有し、DAR4 は、凝集 0% で保持時間 10.88 分を有した。

【0332】

【表 1 2】

40

表 13A. 勾配プロファイル		
時間(分)	移動相 A(%)	移動相 B(%)
0	100	0
16	0	100
18	0	100
18.1	0	10

【0333】

50

質量分析

MS分析前にADC試料を完全に還元した。使用した質量分析法条件は以下の通りである：HPLCカラム=Water BEH300 C4、2.1×50mm、3.5ミクロン粒径；移動相A：水中0.1%ギ酸；移動相B：アセトニトリル中0.1%ギ酸；流量：450μL/分；勾配：0～0.6分、5%B、0.6～1.1分5～90%B、1.1～2.2分90%B、2.2～2.4分、90～5%B、2.4～3.5分5%B；カラム温度：40；MSイオン化供給源：ESI

【0334】

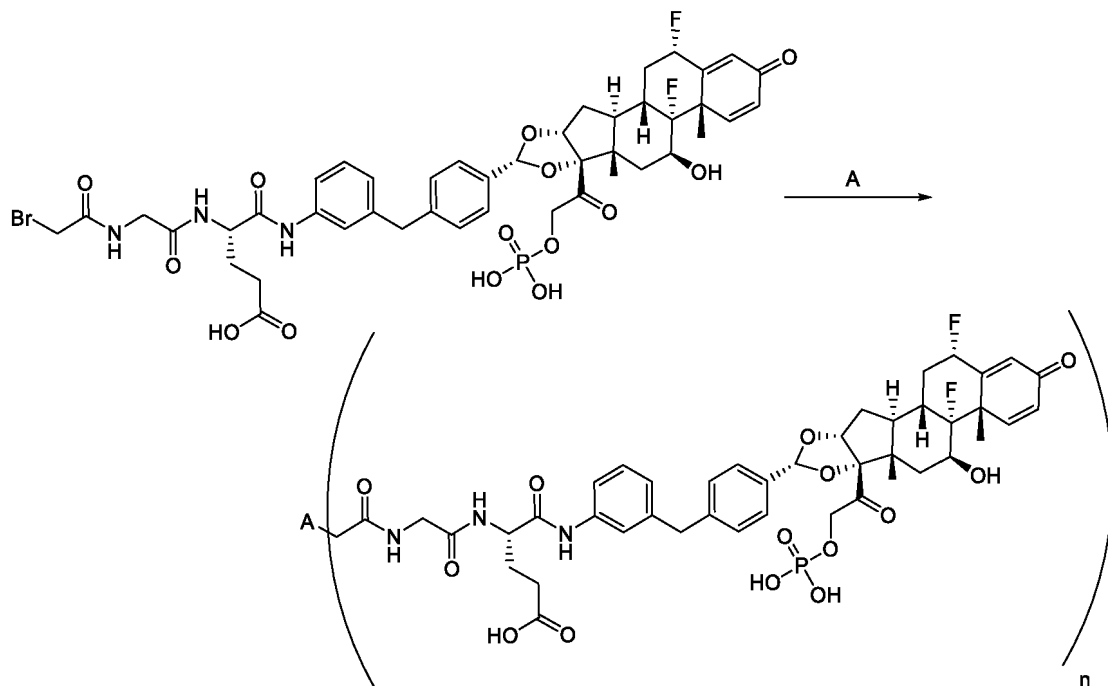
実施例4-コンジュゲート型(ヒト)のデコンボリューション処理した質量分析データが図1Aに示されている(n=4)。25140.73ピークは、1つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした軽鎖(配列番号2)に対応している。50917.59ピークは、1つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした重鎖(配列番号1)に対応している。

【0335】

3. 前駆体実施例28のマウス及びヒトADCの調製

【0336】

【化58】



【0337】

マウスADC

実施例28-コンジュゲート型(マウス)ADCを、マウス抗CD40抗体(抗体138)を使用して、実施例4ADCに従い合成した。DAR2 ADCは、0%凝集で、保持時間7.17分を有し、DAR4は、0%凝集で保持時間10.50分を有した。

【0338】

ヒトADC

約20mg/mLの濃度での410mgのヒト抗CD40抗体(Ab102、表3)を、ジフェニルホスフィノ酢酸(2.7当量)で、約4で終夜還元した。2%(v/v)の2Mトリス緩衝液(pH8.5)を部分的に還元された抗体に加え、これに続いて10当量のジメチルスルホキシド中前駆体実施例28生成物を加えた。室温で3時間のコンジュゲーション後、NAP25脱塩カラムを使用して、混合物を20mMトリス、50mM NaCl、pH8.0へと緩衝液交換をし、AECでさらに精製して、ADCのDAR2(n=2)及びDAR4(n=4)構成成分を生成した(薬物連結した分子の数は還元された鎖間ジスルフィド結合の数に依存する)。装置：AKTA pure；カラム：4X Hitrap Q HP 5mL；移動相：20mMトリス緩衝液に対してA、pH

8.0 ; 20 mM トリス緩衝液に対して B、500 mM NaCl、pH 8.0 ; 勾配 : B、45 CV にあたり 10 % ~ 40 % ; 流量 : 5 mL / 分 ; 波長 : 280 & 260 nm。

【0339】

AEC 条件

ProPacTMSAX - 10、4 × 250 mm、10 μm (Thermo Fisher Scientific、Cat # 054997) 室温 ; 波長 = 280 nm ; 作動時間 = 20 分間 ; 注入量 = 約 20 μg ; 流量 = 1.0 mL / 分間 ; 移動相 A : 20 mM トリス、pH 8.0 ; 移動相 B : 20 mM トリス、1 M NaCl、pH 8.0。

【0340】

【表 13】

10

表 13B. 勾配プロフィール

時間(分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	100	0
16.0	50	50
16.1	0	100
18.0	0	100
18.1	100	0
20.0	100	0

20

【0341】

実施例 28 - コンジュゲート型 (ヒト) の AEC データが図 1 B (n = 2) 及び図 1 D (n = 4) に示されており、保持時間はそれぞれ 0 % 凝集で約 7.5 分間であり、0 % 凝集で約 13 分間である。

【0342】

質量分析

ADC 試料は MS 分析前に完全に還元した。使用した質量分析法条件は以下の通り : HPLC カラム = Water BEH300 C4、2.1 × 50 mm、3.5 ミクロン粒径 ; 移動相 A : 水中 0.1 % ギ酸 ; 移動相 B : アセトニトリル中 0.1 % ギ酸 ; 流量 : 450 μL / 分 ; 勾配 : 0 ~ 0.6 分、5 % B、0.6 ~ 1.1 分 5 ~ 90 % B、1.1 ~ 2.2 分 90 % B、2.2 ~ 2.4 分、90 ~ 5 % B、2.4 ~ 3.5 分 5 % B ; カラム温度 : 40 ; MS イオン化源 : ESI。

30

【0343】

実施例 28 - コンジュゲート型 (ヒト) のデコンボリューション処理した質量分析データが図 1 C (n = 2) 及び図 1 E (n = 4) に示されている。

【0344】

図 1 C (n = 2) に関して、25176.72 ピークは、1 つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした軽鎖 (配列番号 2) に対応する。50954.63 ピークは 1 つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした重鎖 (配列番号 1) に対応する。

40

【0345】

図 1 E (n = 4) に関して、25176.88 ピークは、1 つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした軽鎖 (配列番号 2) に対応する。50954.80 ピークは、1 つの薬物リンカー分子をコンジュゲートした重鎖 (配列番号 1) に対応する。

4. 一般的手順による ADC 並びに実施例 4 及び 28 の ADC の調製

表 14 A は、この一般的方法に従い合成した ADC コンジュゲートを提供し、これらは ADC コンジュゲート集団の画分から試験された (DAR 値が提供されている ; ADC の混合物を含む集団、例えば、n = 2、4、及び / 又は 6 の混合物 ; 凝集データも提供されている)。表 14 B は、前駆体実施例 14 A 及び表 10 に列挙された様々な前駆体のプロ

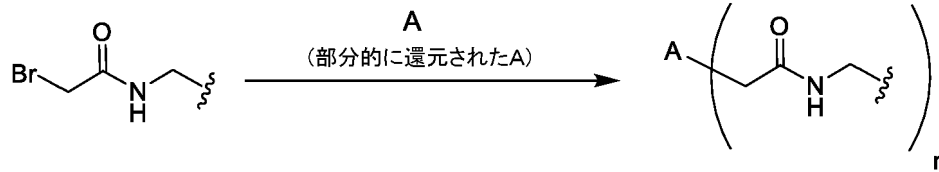
50

モアセトアミド生成物から、上記一般的な方法に従い合成され得るADCコンジュゲートを提供している。変数(A)は抗CD40抗体(ヒト又はマウス)に対応する；n = 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。ヒト抗CD40抗体はAb102(表3)に対応する。マウス抗CD40抗体は、参照により本明細書に組み込まれるUS20160347850に記載の抗体138に対応する。P = 前駆体実施例である。抗体138はAb102と類似の特徴を有し、例えば、抗体138はAb102のように実質的なアゴニスト活性の無いアンタゴニスト抗体である。よって、抗体138はマウスモデルにおいてAb102活性の代表的なものである。

【0346】

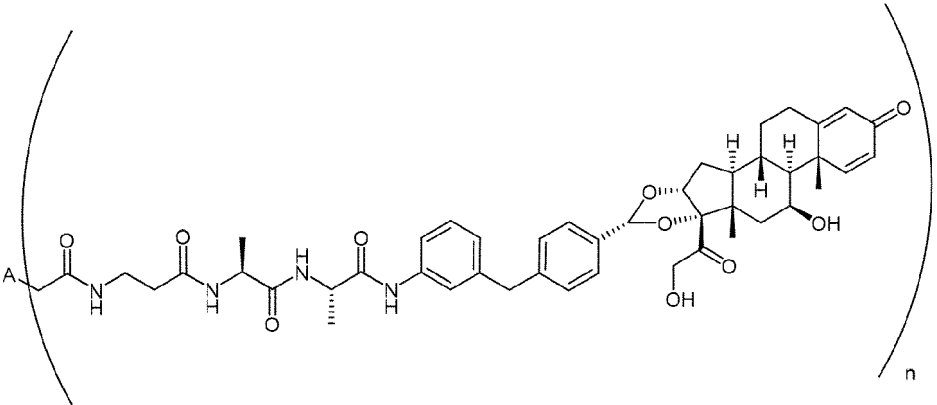
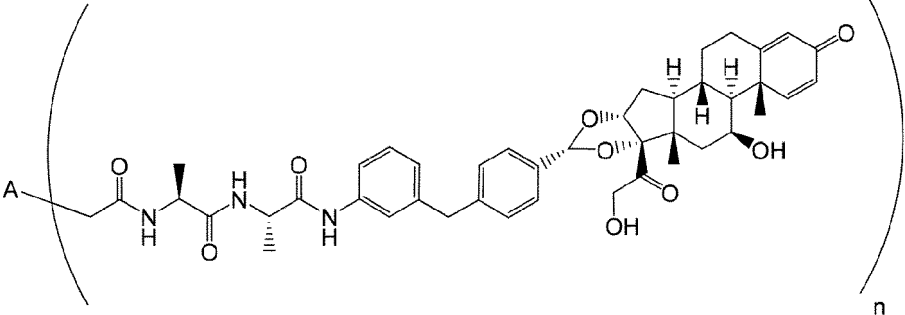
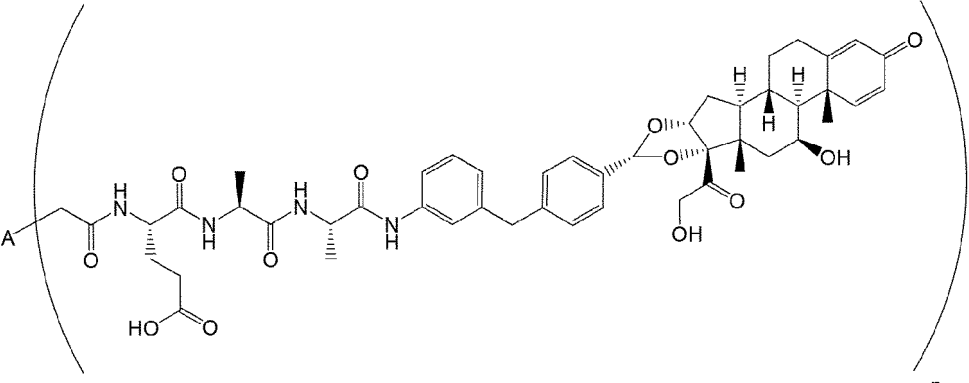
【化59】

10



【0347】

【表 1 4】

	表 14A. 合成されたプロモアセタミドADC	DAR
14B	 <p>実施例 14B-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	3.35
15	 <p>実施例 15-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	3.72
16	 <p>実施例 16-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	3.39

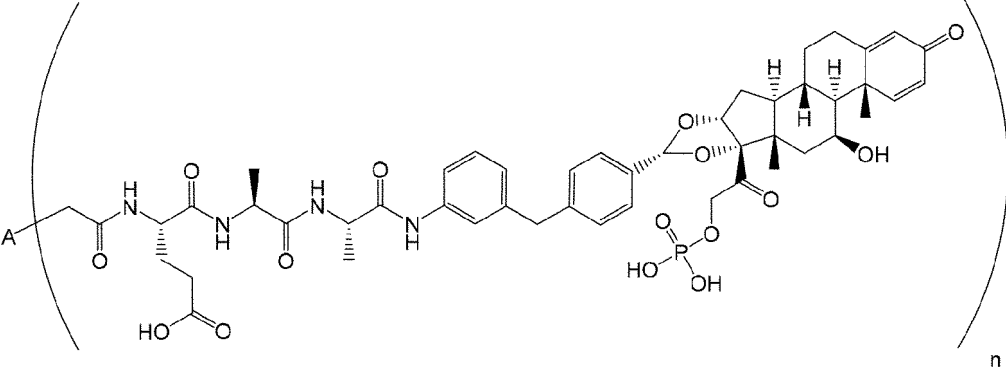
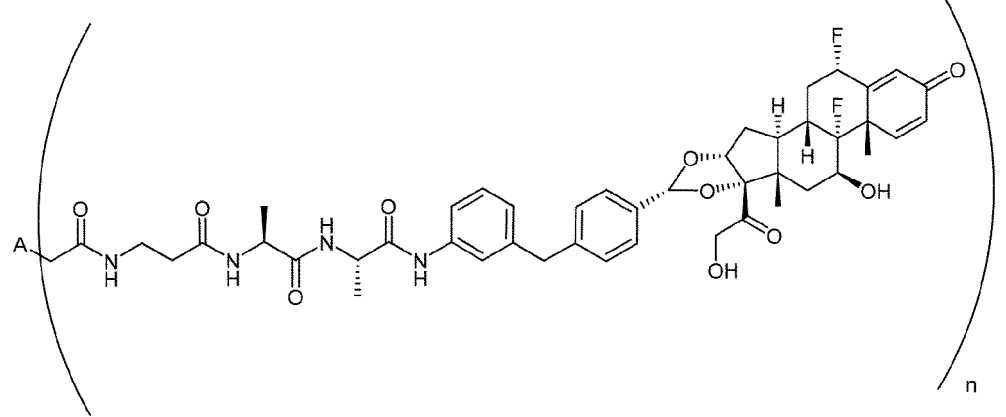
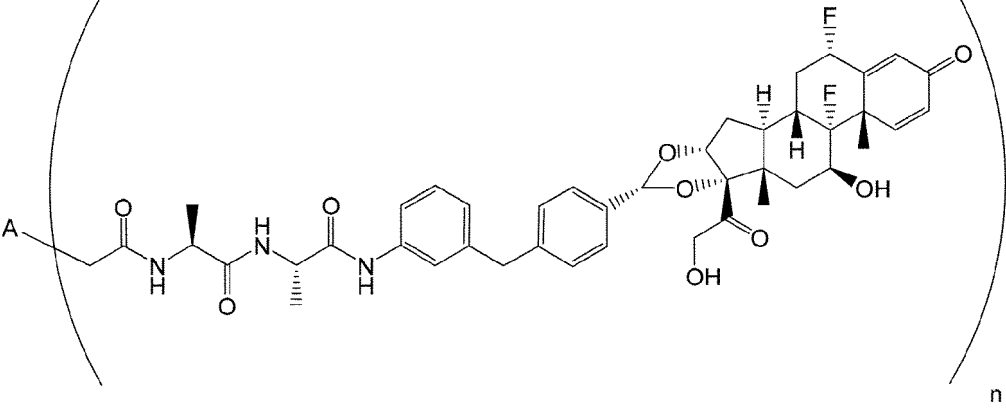
10

20

30

40

表 14A. 合成されたプロモアセタミド ADC	DAR
<div data-bbox="185 450 213 479">17</div> <div data-bbox="256 232 1283 622"> </div> <div data-bbox="584 629 973 707"> 実施例 17-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1 </div>	<div data-bbox="1350 456 1394 486">3.19</div> <div data-bbox="1485 508 1514 537">10</div>
<div data-bbox="177 969 221 999">18B</div> <div data-bbox="256 725 1283 1137"> </div> <div data-bbox="576 1167 979 1229"> 実施例 18B-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1 </div>	<div data-bbox="1350 976 1394 1005">3.65</div> <div data-bbox="1485 896 1514 925">20</div>
<div data-bbox="185 1496 213 1525">19</div> <div data-bbox="256 1274 1283 1664"> </div> <div data-bbox="580 1671 973 1733"> 実施例 19-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1 </div>	<div data-bbox="1350 1503 1394 1532">3.44</div> <div data-bbox="1485 1283 1514 1312">30</div> <div data-bbox="1485 1671 1514 1700">40</div>

	表 14A. 合成されたプロモアセタミド ADC	DAR
20	 <p>実施例 20-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	3.23
21B	 <p>実施例 21B-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	3.59
22	 <p>実施例 22-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	3.50

10

20

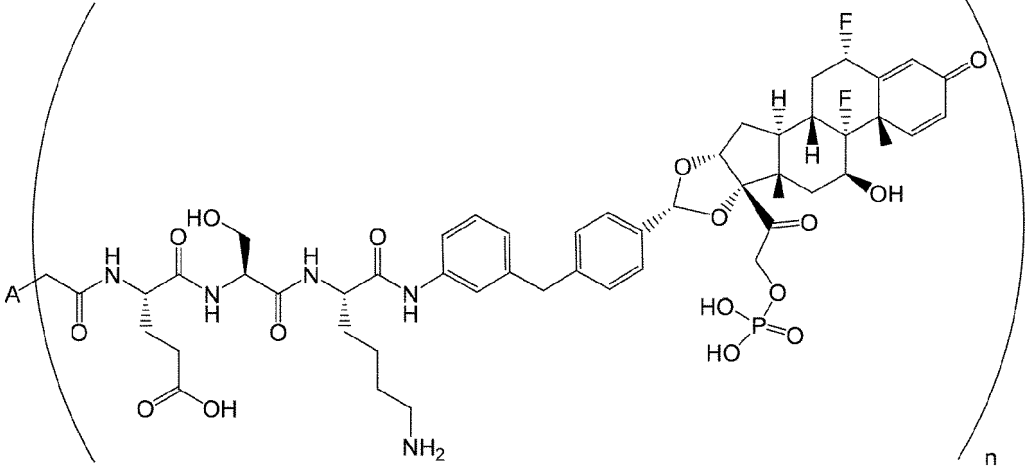
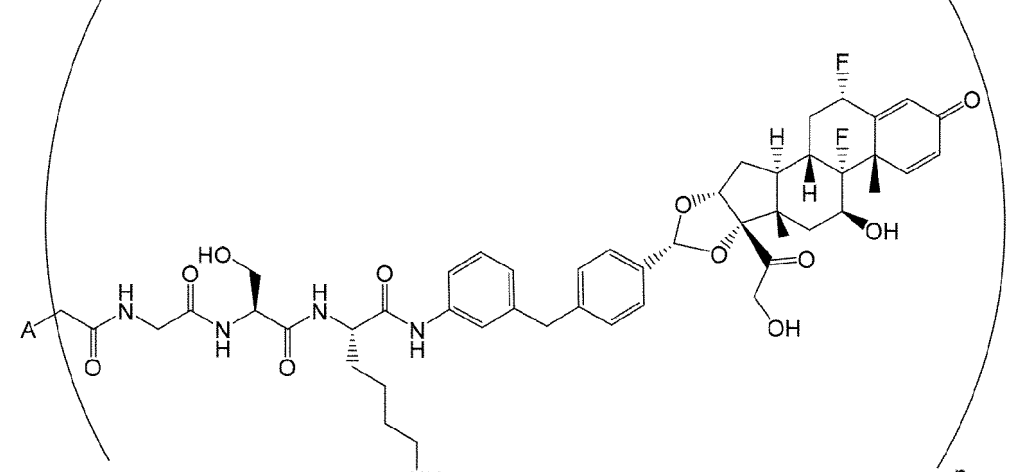
30

40

表 14A. 合成されたプロモアセタミド ADC	DAR
<div data-bbox="183 465 212 495">23</div> <div data-bbox="268 232 1262 645"> </div> <div data-bbox="580 665 967 696">実施例 23-コンジュゲート型(マウス)</div> <div data-bbox="716 714 831 745">凝集(%)≦1</div>	<div data-bbox="1342 474 1386 504">3.56</div> <div data-bbox="1485 510 1514 539">10</div>
<div data-bbox="183 1003 212 1032">24</div> <div data-bbox="309 752 1219 1189"> </div> <div data-bbox="580 1211 967 1243">実施例 24-コンジュゲート型(マウス)</div> <div data-bbox="716 1261 831 1292">凝集(%)≦1</div>	<div data-bbox="1342 1010 1386 1039">3.59</div> <div data-bbox="1485 898 1514 927">20</div> <div data-bbox="1485 1285 1514 1314">30</div>

[illegible]

表 14A. 合成されたプロモアセタミド ADC	DAR
<div data-bbox="185 472 217 501">36</div> <div data-bbox="300 237 1236 656"> </div> <div data-bbox="584 674 975 707">実施例 36-コンジュゲート型(マウス)</div> <div data-bbox="719 723 839 757">凝集(%)=<1</div>	<div data-bbox="1350 479 1398 508">3.62</div> <div data-bbox="1485 508 1517 537">10</div>
<div data-bbox="185 981 217 1010">37</div> <div data-bbox="331 768 1209 1122"> </div> <div data-bbox="584 1162 975 1196">実施例 37-コンジュゲート型(マウス)</div> <div data-bbox="719 1211 839 1245">凝集(%)=<1</div>	<div data-bbox="1350 981 1398 1010">3.44</div> <div data-bbox="1485 898 1517 927">20</div>
<div data-bbox="185 1491 217 1520">38</div> <div data-bbox="323 1256 1217 1675"> </div> <div data-bbox="584 1693 975 1727">実施例 38-コンジュゲート型(マウス)</div> <div data-bbox="719 1742 839 1776">凝集(%)=<1</div>	<div data-bbox="1350 1491 1398 1520">3.45</div> <div data-bbox="1485 1283 1517 1312">30</div> <div data-bbox="1485 1671 1517 1700">40</div>

表 14A. 合成されたプロモアセタミド ADC	DAR
<p>47</p>  <p>実施例 47-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=<1</p>	<p>3.47</p> <p>10</p>
<p>48</p>  <p>実施例 48-コンジュゲート型(マウス) 凝集(%)=1.7</p>	<p>2.12</p> <p>20</p> <p>30</p>

【 0 3 4 8 】

【表 15】

表 14B. 追加のプロモアセタミド ADC

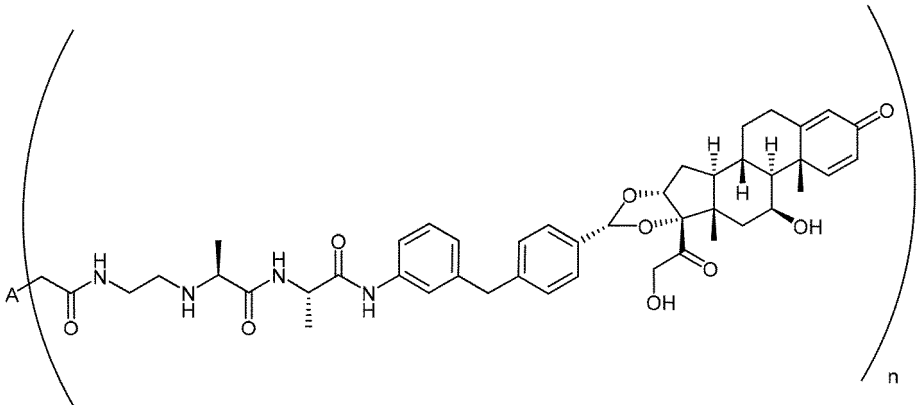
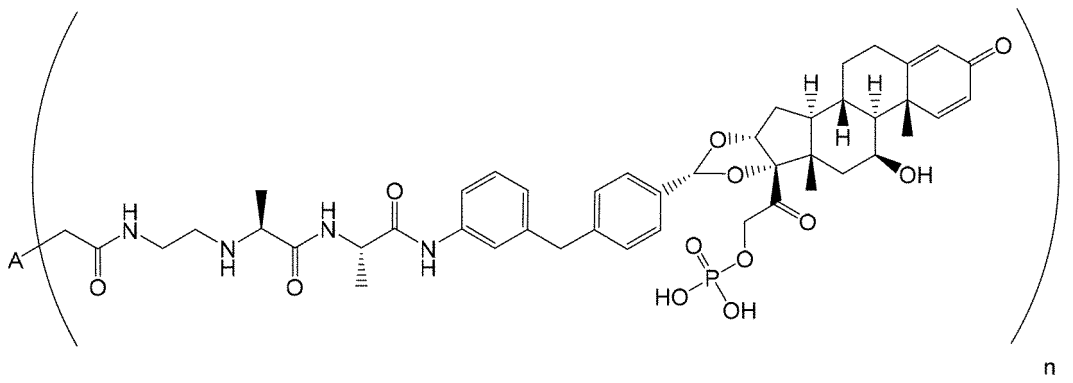
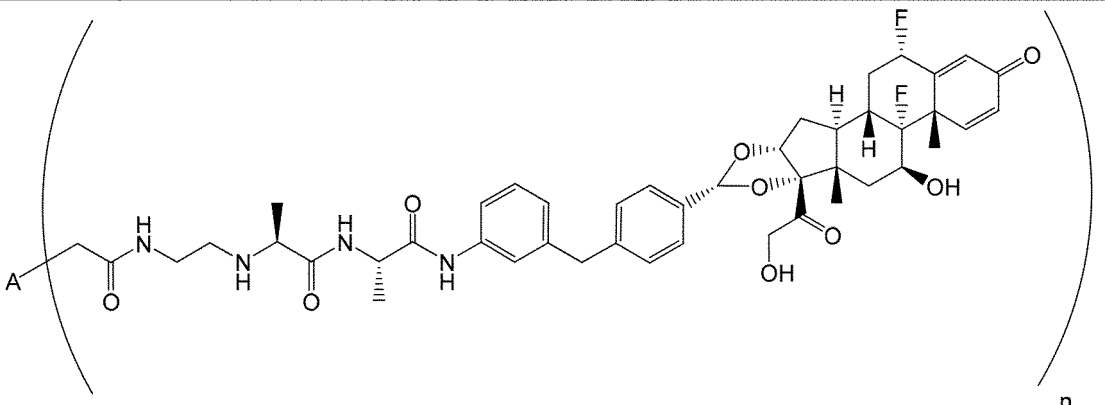
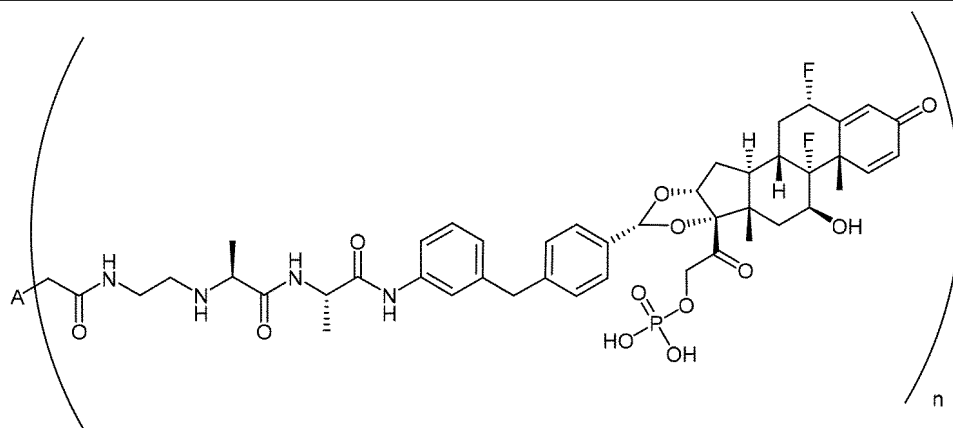
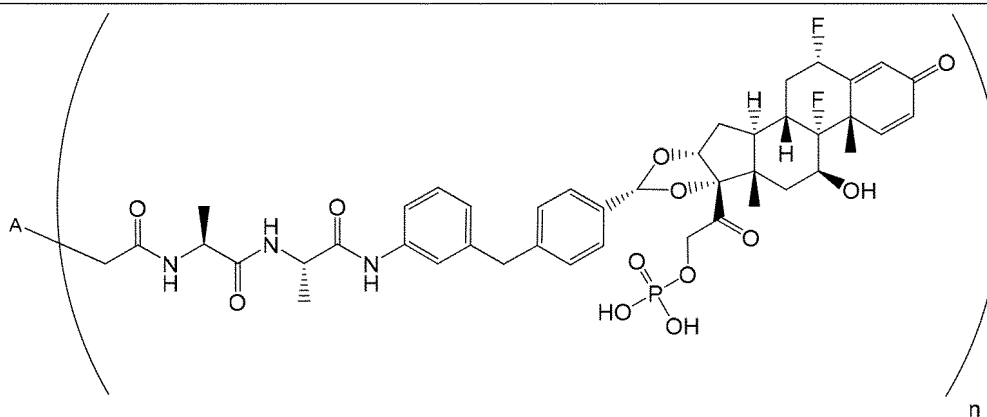
14 A		10
18 A	 <p>実施例 18A-コンジュゲート型</p>	20
21 A	 <p>実施例 21A-コンジュゲート型</p>	30

表 14B. 追加のブロモアセタミド ADC



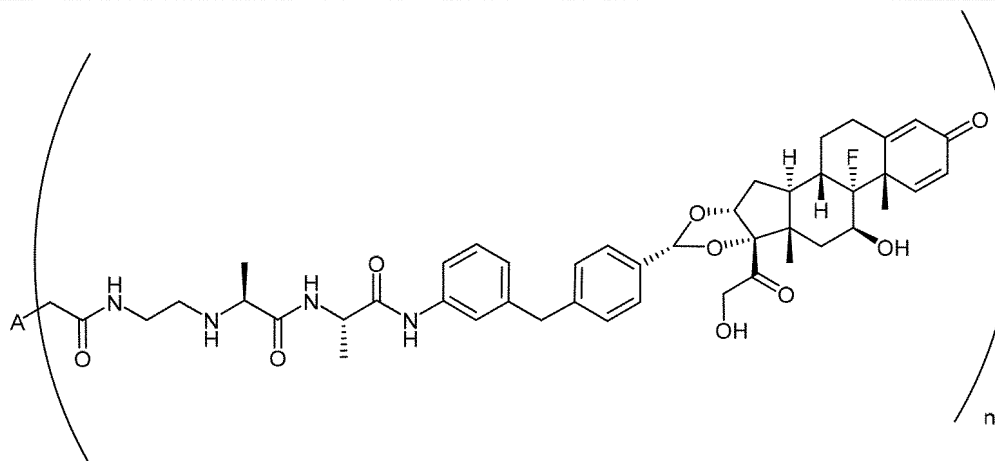
実施例 25A-コンジュゲート型

10



実施例 26-コンジュゲート型

20



実施例 29A-コンジュゲート型

30

40

表 14B. 追加のプロモアセタミド ADC

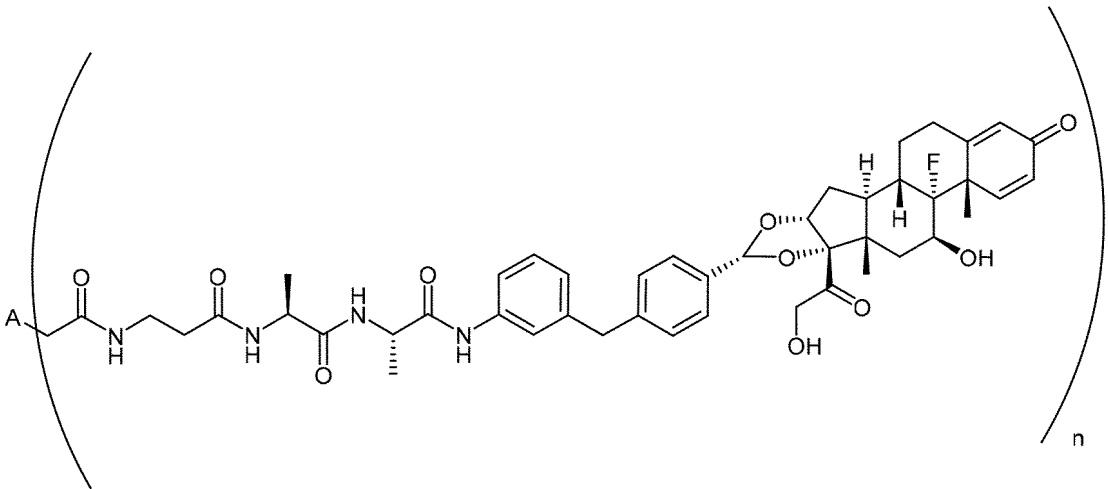
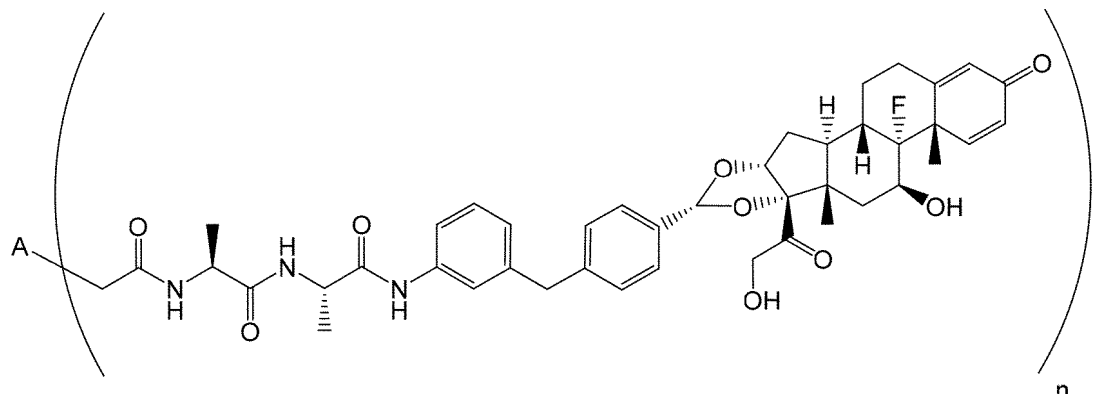
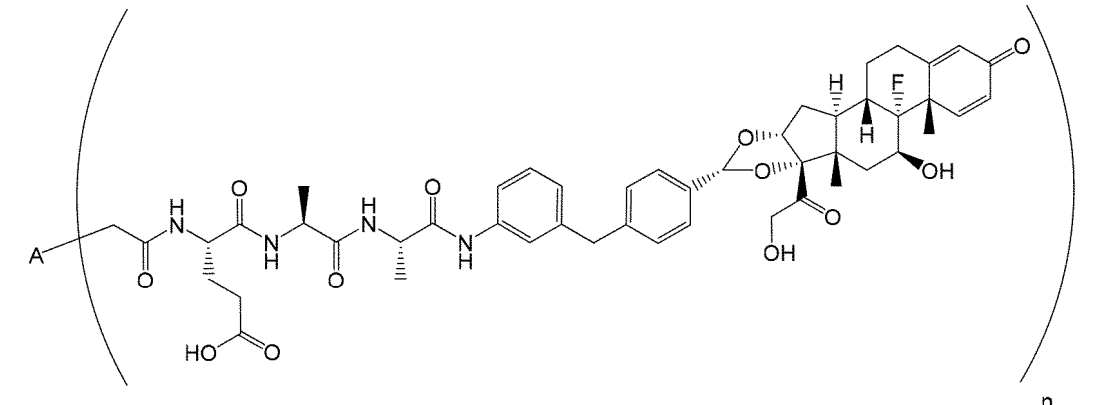
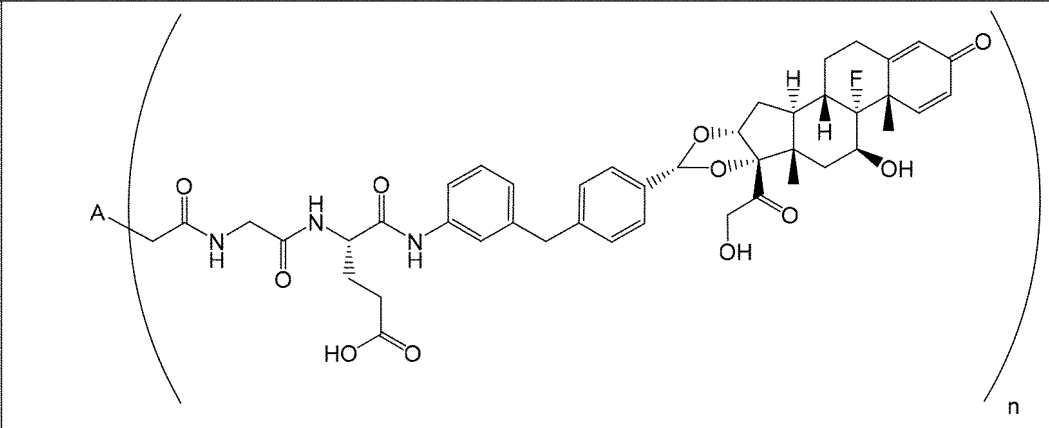
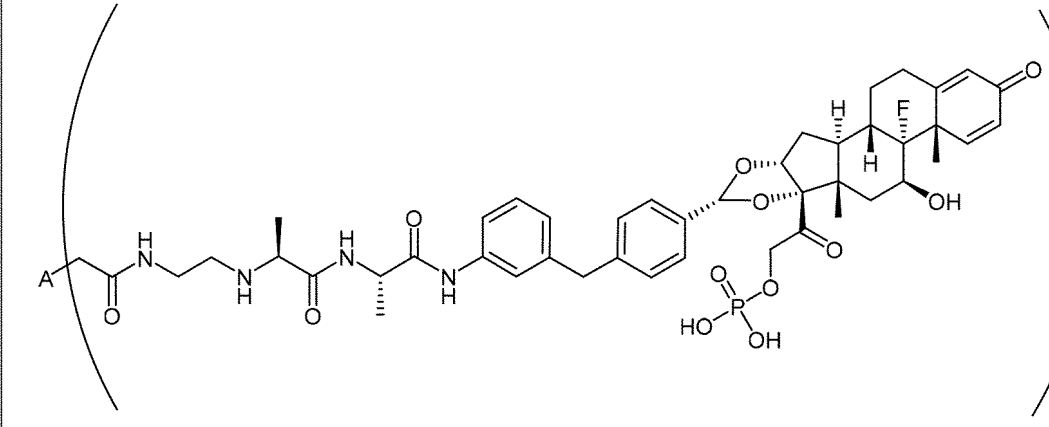
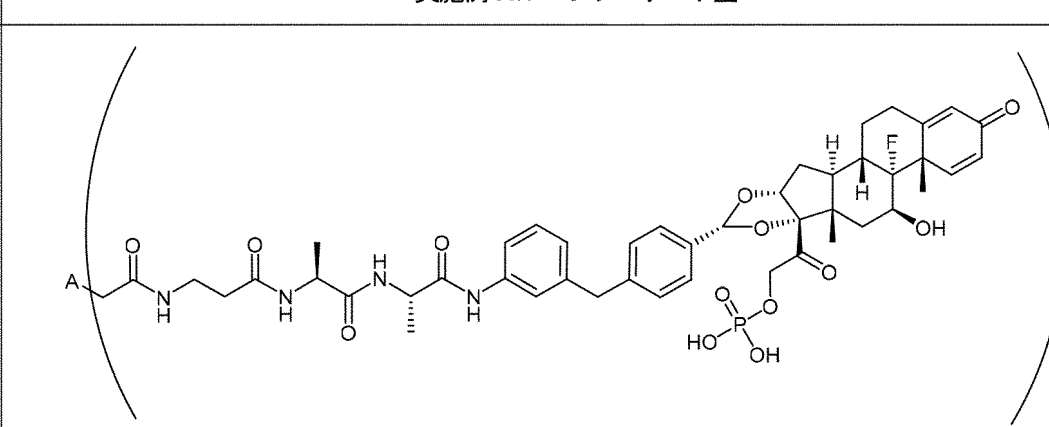
29B		10
	実施例 29B-コンジュゲート型	
30		20
	実施例 30-コンジュゲート型	
31		30
	実施例 31-コンジュゲート型	40

表 14B. 追加のプロモアセタミド ADC

32	 <p>実施例 32-コンジュゲート型</p>	10
33 A	 <p>実施例 33A-コンジュゲート型</p>	20
33B	 <p>実施例 33B-コンジュゲート型</p>	30 40

10



表 14B. 追加のプロモアセタミド ADC

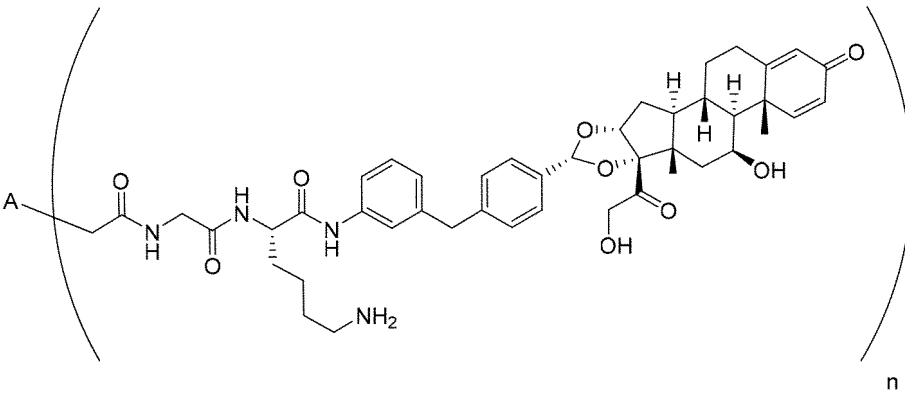
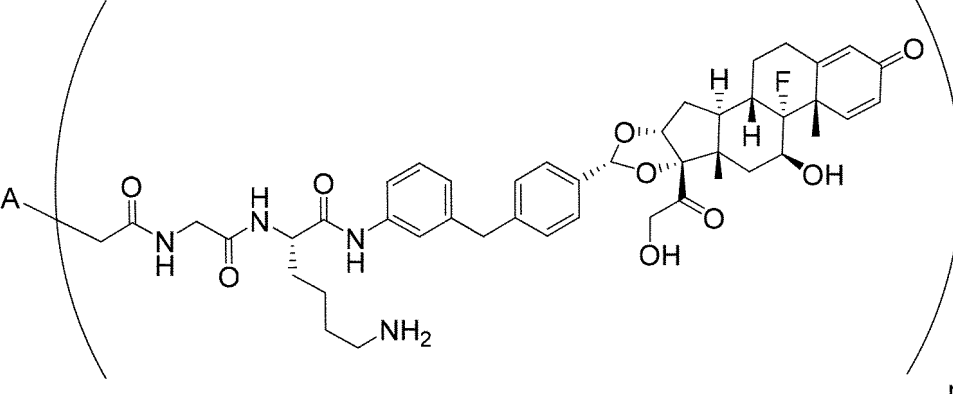
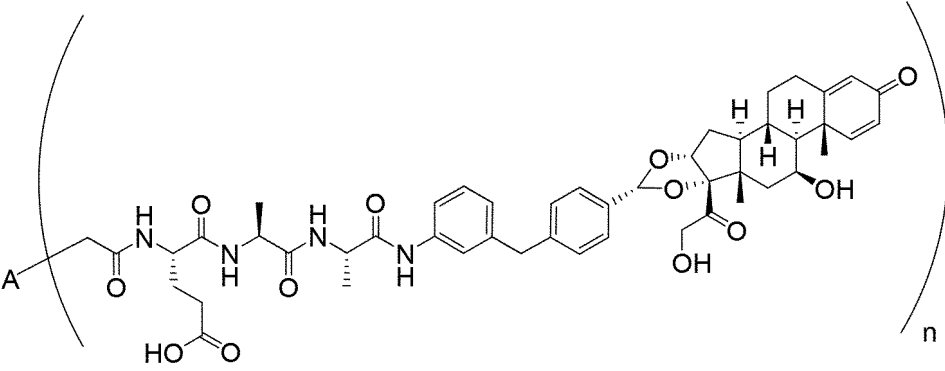
40	 <p>実施例 40-コンジュゲート型</p>	10
41	 <p>実施例 41-コンジュゲート型</p>	20
42	 <p>実施例 42-コンジュゲート型</p>	30

表 14B. 追加のプロモアセタミドADC

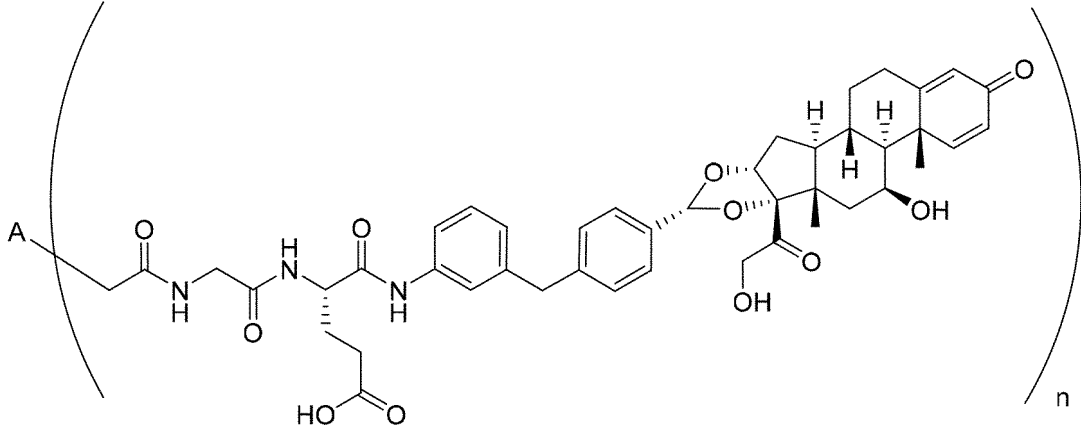
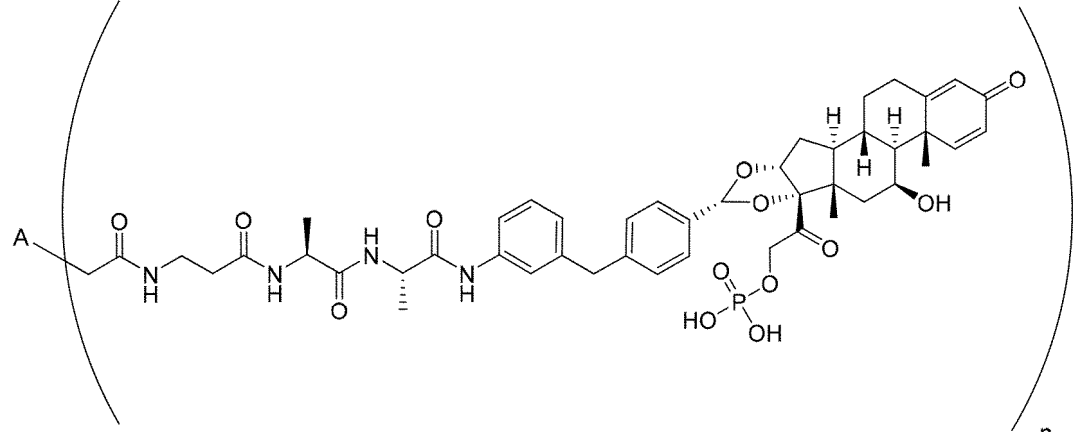
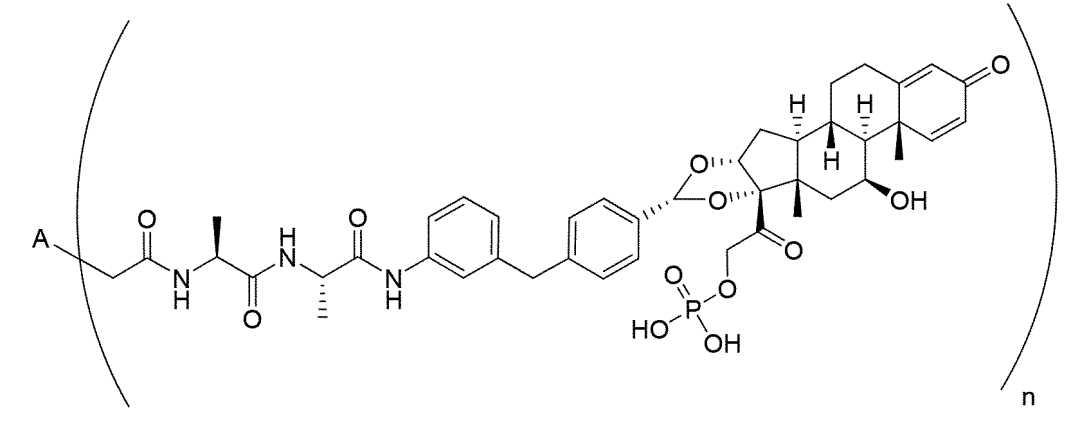
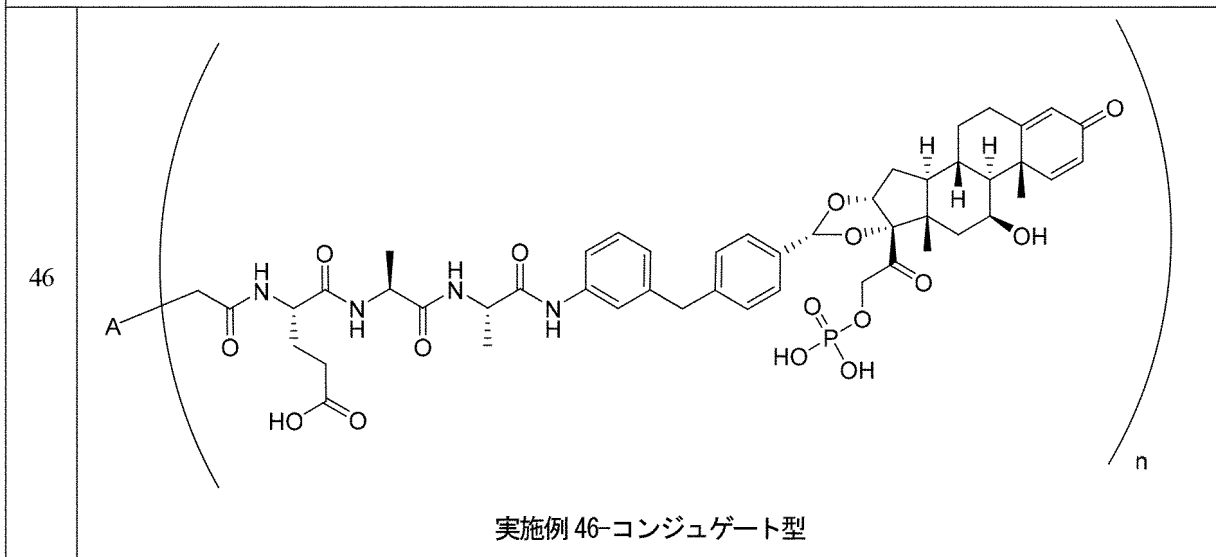
43	 <p>実施例 43-コンジュゲート型</p>	10
44	 <p>実施例 44-コンジュゲート型</p>	20
45	 <p>実施例 45-コンジュゲート型</p>	30 40

表 14B. 追加のプロモアセタミド ADC



10

20

30

40

50

【 0 3 4 9 】

生物学的アッセイ

【 0 3 5 0 】

【 表 1 6 】

表 15. 略語

MEM	最小必須培地	CS FBS	チャコール処理ウシ胎児血清
NEAA	非必須アミノ酸	FBS	ウシ胎児血清
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	DBP	フタル酸ジブチル
DTT	ジチオトレイトール	HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸
GM-CSF	顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子	CFA	完全フロイントアジュバント
PINP	プロコラーゲン1型アミノ末端プロペプチド	ACTH	副腎皮質刺激ホルモン
DBP	フタル酸ジブチル	DTT	ジチオトレイトール

【 0 3 5 1 】

【 実施例 A 】 ヒト及びマウスの CD 4 0 GRE リポーター細胞株の生成

親細胞株を作り出すため、2 mL の完全成長培地 (RPMI、10% FBS、1% L - グルタミン、1% Na ビルベート及び1% MEM NEAA) を有する6ウェルシャーレ (Costar: 3516) に、HEK 293 細胞を、1ウェル当たり250,000個の細胞で37、5% CO₂ で24時間播種した。翌日、3 µg の pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316) 及び3 µl の PLUS 試薬 (Invitrogen: 10964-021) を244 µL の Opti-MEM (Gibco: 31985-070) に入れて希釈し、室温で15分間インキュベートした。pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] ベクターは、いくつかの核内受容体、例えば、グルココルチコイド受容体及びアンドロゲン受容体などの活性化に应答して

ルシフェラーゼレポーター遺伝子 *luc2P* の転写を促進する MMTV LTR (Murine Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat) を含有する。インキュベーション後、希釈された DNA 溶液を、1:1 リポフェクタミン LTX 溶液 (Invitrogen: 94756) (13.2 μ l + 256.8 μ l の Opti-MEM) と共に予備インキュベートし、室温で 25 分間インキュベートして、DNA - リポフェクタミン LTX 複合体を形成した。インキュベーション後、500 μ l の DNA - リポフェクタミン複合体を、細胞を含有するウェルに直接加えた。HEK293 細胞を 37 °、5% CO₂ で 24 時間形質移入した。インキュベーション後、細胞を 3 mL のリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) で洗浄し、2 週間の間、100 μ g / mL のハイグロマイシン B (Invitrogen: 10687-010) を含有する完全成長培地で選択した。「HEK293 GREpGL4.36 [Luc2P / MMTV / Hygro]」細胞を生成した。

10

【0352】

マウス CD40 形質移入した細胞株を作り出すために、2 mL の完全成長培地 (RPMI、10% FBS、1% L - グルタミン、1% Na ピルベート及び 1% MEM NEAA) を有する 6 ウェルシャーレ (Costar: 3516) に、HEK293 細胞を、1 ウェル当たり 250,000 個の細胞で、37 °、5% CO₂ で 24 時間播種した。翌日、3 μ l の FuGENE6 Transfection Reagent (Promega: E2311) を 96 μ l の非補充 RPMI 培地に入れて希釈し、室温で 5 分間インキュベートした。インキュベーション後、1 μ g の NEF39 mCD40 HA ICDD4 (PDL / FACET Biopharma) を形質移入混合物に加え、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、希釈した DNA 溶液は、細胞を 1 ウェル当たり 100 μ l 含有するウェルに滴下添加した。HEK293 細胞を 37 °、5% CO₂ で 24 時間形質移入した。インキュベーション後、細胞を 3 mL の PBS で洗浄し、2 週間の間、500 μ g / mL の G418 (Gibco: 10131-027) を含有する完全成長培地で選択した。生成した細胞株は「mCD40 __ HEK293」と指定した。

20

【0353】

マウス CD40 GRE リポーター細胞株を作り出すために、2 mL の完全成長培地 (RPMI、10% FBS、1% L - グルタミン、1% Na ピルベート及び 1% MEM NEAA) を有する 6 ウェルシャーレ (Costar: 3516) に、mCD40 で安定的に形質移入した HEK293 細胞を、1 ウェル当たり 250,000 個の細胞で、37 °、5% CO₂ で 24 時間播種した。翌日、3 μ g の pGL4.36 [Luc2P / MMTV / Hygro] (Promega: E316) 及び 3 μ l の PLUS 試薬 (Invitrogen: 10964-021) を、244 μ l の Opti-MEM (Gibco: 31985-070) に入れて希釈し、室温で 15 分間インキュベートした。インキュベーション後、希釈した DNA 溶液を、1:1 リポフェクタミン LTX 溶液 (Invitrogen: 94756) (13.2 μ l + 256.8 μ l の Opti-MEM) と共に予備インキュベートし、室温で 25 分間インキュベートして、DNA - リポフェクタミン LTX 複合体を形成した。インキュベーション後、500 μ l の DNA - リポフェクタミン複合体を、細胞を含有するウェルに直接加えた。HEK293 細胞を 37 °、5% CO₂ で 24 時間形質移入した。インキュベーション後、細胞を 3 mL の PBS で洗浄し、2 週間の間、100 μ g / mL のハイグロマイシン B (Invitrogen: 10687-010) 及び 500 μ g / mL の G418 (Gibco: 10131-027) を含有する完全成長培地で選択した。生成した細胞株は「mCD40 __ HEK293 GREpGL4.36 [Luc2P / MMTV / Hygro]」と指定した。

30

40

【0354】

ヒト CD40 GRE リポーター細胞株を作り出すために、1 mL の完全成長培地 (RPMI、10% FBS、1% L - グルタミン、1% Na ピルベート及び 1% MEM NEAA) を有する 6 ウェルシャーレ (Costar: 3516) に、HEK293 pG

50

L4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] 細胞を、1 ウェル当たり 250,000 個の細胞で播種した。次いで、3 μ g のヒト CD40 Transcript 1 (Myc-DDK-タグ付き) DNA (Origene Cat# RC201977) 及び 3 μ L の PLUS 試薬 (Invitrogen: 10964-021) を、500 μ L の Opti-MEM (Gibco: 31985-070) に入れて希釈した。DNA 溶液を、1:1 リポフェクタミン LTX 溶液 (Invitrogen: 94756) (11 μ L + 500 μ L Opti-MEM) 共に予備インキュベートし、室温で 15 分間インキュベートして、DNA-リポフェクタミン LTX 複合体を形成した。インキュベーション後、1,000 μ L の DNA-リポフェクタミン複合体を、細胞を含有するウェルに直接加えた。HEK293pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] 細胞を、37 $^{\circ}$ 、5% CO₂ で 24 時間形質移入した。インキュベーション後、細胞を 3 mL の PBS で洗浄し、2 週間の間、100 μ g/mL のハイグロマイシン B (Invitrogen: 10687-010) 及び 500 μ g/mL の G418 (Gibco: 10131-027) を含有する完全成長培地で選択した。生成した細胞株は「hCD40 transcript 1__HEK293 GRE pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]」と指定した。

10

【0355】

【実施例 B】 GRE リポーターアッセイにおける抗 CD40 ADC の活性

HEK293 親 GRE (pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]) 細胞及び HEK293mCD40 又は hCD40 GRE (pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]) 細胞、1 ウェル当たり 20,000 個の細胞を、96 ウェル組織培養物処理した白色プレート (Costar: 3917) 上で、75 μ L のアッセイ培地 (RPMI、1% CSFBS、1% L-グルタミン、1% Naピルベート及び 1% MEA) 内にプレーティングし、37 $^{\circ}$ 、5% CO₂ で 24 時間インキュベートした。翌日、細胞を、アッセイ培地内の 25 μ L の 4 \times 段階希釈したマウス又はヒト抗 CD40 抗体薬物コンジュゲート、ステロイド化合物、又は培地単独で処理し、37 $^{\circ}$ 、5% CO₂ で 72 時間インキュベートした。72 時間のインキュベーション後、細胞を 100 μ L の Dual-Glo ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega-E2920) で 10 分間処理し、Microbeta (PerkinElmer) を使用して発光について分析した。4 種のパラメーター曲線フィットを使用してデータを分析して、EC₅₀ 値を生成した。最大活性化パーセント (%) を 100 nM デキサメタゾン (最大活性化と考えられた) に対して正規化した。それぞれ抗マウス CD40 ADC と抗ヒト CD40 ADC の両方に対する EC₅₀ 値が表 16 及び 17 にそれぞれ提供されている。

20

30

【0356】

【表 17】

表 16. ヒト CD40GRE リポーターアッセイにおける抗マウス CD40 ADC のインビトロ活性						
ADC	n	モノマー% (SEC)	mCD40 GRE EC ₅₀ (μg/ml)	mCD40 GRE (最大%)	HEK293 GRE EC ₅₀ (μg/ml)	HEK293 GRE (最大%)
実施例 6- 加水分解型 (マウス)	4	99.4	0.11	84.2	5.7	100
実施例 7- 加水分解型 (マウス)	4	100	0.42	82.2	>50	52.3
実施例 12- 加水分解型 (マウス)	2	100	0.15	104	9.79	93
実施例 12- 加水分解型 (マウス)	4	100	0.14	108	6.6	96
実施例 28 (マウス)	4	99.8	0.23	118	19.15	83

10

20

【 0 3 5 7 】

30

【表 18】

表 17. ヒト CD40 GRE リポーターアッセイにおける抗ヒト CD40 ADC のインビトロ活性						
ADC	n	モノマ ー%	hCD40 GRE EC ₅₀ (μg/ml)	hCD40 GRE (最大%)	HEK293 GRE EC ₅₀ (μg/ml)	HEK293 GRE (最大%)
実施例 12- 加水分解型(ヒト)	4	98.2	0.19	163	>17	117
実施例 13- 加水分解型 (ヒト)	4	99.8	0.29	67	>50	27
実施例 28 (ヒト)	2	100	16.5	90	>50	82
実施例 28 (ヒト)	4	100	0.53	77	>50	64
実施例 4 (ヒト)	4	100	6.57	88	>50	21

SEC=サイズ排除クロマトグラフィーにより測定

【0358】

[実施例 C] リポ多糖及び溶解性 CD40 リガンド刺激されたヒト単球由来の DC サイトカイン放出アッセイにおける抗 CD40 ADC の活性

初代ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を Sanguine Biosciences から購入し、50 mL のリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) (pH 7.2) 中で洗浄し、5% DMSO を有する 100% FBS 中に再懸濁させ、アリコートし、使用するまで液体窒素内で凍結保存した。PBMC を解凍し、0.5% FBS 及び 2 mM EDTA を有する PBS (pH 7.2) 中で洗浄した。製造業者プロトコルに従い、Miltenyi Whole Blood CD14 MicroBeads キット (Cat # 130-090-879) 及び Miltenyi autoMACS Pro Separator を使用して、CD14+ 細胞のポジティブ選択により、PBMC からの単球を富化した。精製した単球を洗浄し、10% FBS、L-グルタミン (Gibco Cat # 25030081)、ピルビン酸ナトリウム (Gibco Cat # 11360070)、MEM 非必須アミノ酸溶液 (Gibco Cat # 11140050)、ペニシリン - ストレプトマイシン (Gibco Cat # 15140122)、HEPES 緩衝液 (Gibco Cat # 15630080)、2-メルカプトエタノール (Gibco Cat # 21985023) を補充した RPMI 中に再懸濁した。細胞は、1 mL 当たり 1.00×10^6 個の細胞及び 1 ウェル当たり 3 mL で 6-ウェルプレート (Corning Cat # 3506) に移し、100 ng/mL の rhGM-CSF (R&D Systems、Cat # 215-GM-010/CF) 及び 100 ng/mL の rhIL-4 (R&D Systems、Cat # 204-IL-010/CF) と共に 37 °C 及び 5% CO₂ で、5 日間インキュベートして、単球の樹状細胞 (DC) への分化を誘発した。第 5 日目、半接着単球由来の DC (MoDC) をプールし、CD1a- ポジティブ CD14- ネガティブ細胞 (Biolegend Cat # 300106、Cat # 325628) に対して

、フローサイトメトリーを使用して表現型検査によりこれらの分化効率を確認した。M o D Cを洗浄し、補充したR P M I培地に再懸濁し、細胞アッセイプレート (C o s t a r C a t # 3 7 9 9) に1ウェル当たり 1.0×10^5 個の細胞をプレーティングした。細胞を、リポ多糖 (L P S) (S i g m a C a t # L 4 3 9 1 - 1 M G) で、 0.1 ng/mL で2時間刺激して、M o D C上の細胞表面C D 4 0発現の上方調節を誘発させた。刺激後、培養物上清を洗浄し、異なる濃度の抗ヒトC D 4 0抗体又は抗ヒトC D 4 0 A D Cと共に、細胞を37 及び5 % C O ₂ で2時間インキュベートした。次いで、細胞を 0.2 ng/mL のL P S及び $0.5 \mu\text{g/mL}$ の溶解性C D 4 0リガンド (C D 4 0 L) (A d i p o g e n C a t # A G - 4 0 B - 0 0 1 0) で20時間刺激した。インキュベーション後、1200rpmで5分間プレートを回転させ、150 μL の上清培地を追加の96 - ウェルプレートに直接移し、I L - 6 (M S D、# K 1 5 1 A K B) 濃度について分析した。非線形回帰を使用して、用量反応データをシグモイド曲線にフィットし、G r a p h P a d P r i s m 6 (G r a p h P a d S o f t w a r e、I n c .) の助けを借りてI C ₅₀ 値を計算した。表18に示されている結果は、活性化した初代免疫細胞からの炎症誘発性サイトカインI L - 6の放出を阻害することにおいて抗ヒトC D 4 0 A D Cが強力な活性を有し、実施例13 - 加水分解型 (ヒト) と実施例12 - 加水分解型 (ヒト) A D C (式中、nは4である。) との間の作用強度の差異が2種のペイロード化合物の間の作用強度の差異に対応することを実証している。表18はまた、実施例28 - コンジュゲート型 (ヒト) A D C (式中、nは2である。)、及び実施例28 - コンジュゲート型 (ヒト) A D C (式中、nは4である。) に対して類似の結果を提供している。図2に示されている代表的な実施例の結果は、実施例13 - 加水分解型 (ヒト) 及び実施例12 - 加水分解型 (ヒト) (式中、nは4である。) のいずれかによる免疫細胞活性化を阻害する最大能力が、親のアンタゴニスト抗体により提供される阻害を超えることを実証している。

10

20

【0359】

【表 19】

表 18. LPS 及び CD40L で刺激されたヒト MoDC サイトカイン放出アッセイ (N=3) における抗ヒト CD40 ADC のインビトロ活性				
対照又は ADC	モノマー% (SEC)	IL-6 放出 IC ₅₀ (μ g/ml)	最大阻害 (%)	n
対照 1 hCD40 mAb	100	0.18	44.5	NA
対照 2* 実施例 12-加水分解型 イソタイプ (Ab=抗破傷風トキソイド、 ヒトイソタイプ)*	97.7	3.3	18.2	4
実施例 13-加水分解型 (ヒト)	99.8	0.14	83.3	4
実施例 12-加水分解型 (ヒト)	98.2	0.04	99.5	4
実施例 28-コンジュゲート 型(ヒト)	100	0.03	81.8	2
実施例 28-コンジュゲート 型(ヒト)	100	0.05	87.6	4

*イソタイプ抗体は、破傷風トキソイドを標的とする抗体であり、異種移植片モデルに存在する抗原を認識しない IgG を投与する作用についての対照として使用されている。例えば、US20170182179 を参照されたい。上記記載のヒトイソタイプ ADC は、破傷風トキソイドワクチンを認識するヒト抗体のクローン化可変ドメインから得られた。これは、ヒト細胞によりインビトロ又はインビボで発現することが予想されない抗原である。

SEC=サイズ排除クロマトグラフィーで測定されたもの

【 0 3 6 0 】

[実施例 D] 骨髄由来の DC 活性化アッセイにおける抗マウス CD40 ADC の活性
マウス骨髄 (BM) 細胞を、C57BL/6 マウスの大腿及び脛骨から押し出し、補充した RPMI 培地に再懸濁した。細胞は、1 mL 当たり 1.00×10^6 個の細胞及び 1 ウェル当たり 5 mL で、6 - ウェルプレート (Corning Cat # 3506) に移し、 10 ng/mL のマウス GM-CSF (R&D Systems Cat # 415-M L-010) と共に 37 °C 及び 5% CO₂ で 8 日間インキュベートした。培養の 3 日目及び 5 日目において、培地の 2/3 を 20 ng/mL の IL-4 を補充した培地を含有する新鮮な GM-CSF と置き換えて、BM 細胞の樹状細胞 (DC) への分化を誘発した。インキュベーション後、これら BM 由来の DC (BMDC) を洗浄し、補充した RPMI 培地に再懸濁し、細胞アッセイプレート (Costar Cat # 3799) にプレーテ

イングした。細胞をリボ多糖 (LPS) (Sigma Cat # L4391-1MG)、
0.1 ng/mL で2時間刺激して、BMDC 上での細胞 - 表面CD40 発現の上方調節
を誘発した。刺激後、培養物上清を洗浄し、細胞を異なる濃度の抗マウスCD40 抗体又
は実施例6 - 加水分解型 (マウス) と共に、37℃ 及び5% CO₂ で2時間インキュベ
ートした。次いで、細胞を0.1 ng/mL のLPS 及び0.5 µg/mL の溶解性CD
40 リガンド (CD40L) (Enzo Life Sciences, Inc. Cat
ALX-522-120-C010) で20時間刺激した。一部の実験では、LPS 処
理を異なる濃度 (0.1、1.0、10 ng/mL) で試験したが、溶解性CD40L は
0.5 µg/mL のままであった。インキュベーション後、プレートを1200 rpm で
5分間回転させ、150 µL の上清培地を追加の96 - ウェルプレートに直接移し、IL
- 6 (MSD、Cat # K152TXK) 濃度について分析した。DC 活性化マーカーの
上方調節を定量化するため、アッセイプレートに残留する培養細胞を洗浄し、抗マウスC
D86 抗体 (GL-1、Biolegend Cat # 105018) で着色し、フロー
サイトメトリーで評価した。非線形回帰を使用して、用量反応データをシグモイド曲線フ
ィットし、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software,
Inc.) の助けを借りてIC₅₀ 値を計算した。実施例12 - 加水分解型 (マウス) 及
び実施例28 (マウス) を用いて追加の実験を行った。表19に示されている結果は、抗
マウスCD40 ADC が、活性化した初代免疫細胞上での共刺激分子発現の上方調節の
抑制において強力な活性を示し、ADC 間での作用強度の差異が薬物 - リンカーペイロー
ド間の作用強度の差異に対応することを実証している。図3に示されている結果は、実施
例6 - 加水分解型 (マウス) による免疫細胞活性化を阻害する最大能力は、親のアンタゴ
ニスト抗体で提供される阻害を超えることを実証している。

10

20

【0361】

【表 20】

表 19. LPS 及び CD40L 刺激されたマウス BMDC 活性化アッセイ (N=3) における抗マウス CD40 ADC のインビトロ活性				
対照又は ADC	モノマー% (SEC)	CD86 発現 IC ₅₀ (μ g/ml)	最大阻害 (%)	n
対照 1 mCD40 mAb	100	0.13	35.6	NA
対照 2* 実施例 6-加水分解型 イソタイプ (Ab=抗破傷風トキソイド、 マウスイソタイプ)	100	1.06	37.5	4
実施例 6-加水分解型 (マウス)	100	0.15	118.4	4
実施例 12-加水分解型 (マウス)	100	0.06	94.2	4
実施例 28(マウス)	99.8	0.10	90.8	4

*イソタイプ抗体は破傷風トキソイドを標的とする抗体であり、異種移植片モデルに存在する抗原を認識しない IgG を投与する作用について、対照として使用される。例えば、US20170182179 を参照されたい。上に記載されたマウスイソタイプ ADC は破傷風トキソイドワクチンを認識するマウス抗体のクローン化可変ドメインから得た。これは、マウス細胞によりインビトロ又はインビボで発現することが予想されない抗原である。

SEC=サイズ排除クロマトグラフィーで測定されたもの

【0362】

[実施例 E] LPS 誘発性急性炎症のインビボモデルにおける抗マウス CD40 ADC の活性

C57BL/6 雌のマウス (n = 3) に、1 μ g の LPS 及び (1) 対照 1 としての親アンタゴニスト抗体 (mCD40 mAb)、(2) 実施例 6 - 加水分解型イソタイプ (Ab = 抗破傷風トキソイド、マウスイソタイプ) (n = 4)、又は (3) ADC としての実施例 6 - 加水分解型 (マウス) (10 mg/kg) (n = 4) のいずれかを含有する 100 μ L のリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) (pH 7.2) を腹腔内投与した。注入後 24 時間の時点で、処置したマウスから脾臓を収集し、処理して、それぞれ個々のマウスからシングルセル懸濁液を得た。細胞は、フローサイトメトリーを使用して、表現型特異的抗原を提示する細胞集団に対して以下の蛍光色素標識抗体で着色した：抗マウス CD4 PE (Biolegend Cat # 100408)、抗マウス CD8 BUV395 (BD Cat # 563786)、抗マウス CD19 PE-Cy7、抗マウス CD11c PerCp-Cy5.5、抗マウス CD11b BV510、抗マウス IAIE Pa

c i f i c B l u e、抗マウスCD40 APC、抗マウスCD86 Alexa - 488。細胞は、1% FBS 及びFcR - 遮断試薬 (BD、Cat # 553142) を含有するPBS (pH 7.2) 中1mL 当たり 1.0×10^7 個の細胞において着色した。脾臓1個当たりの活性化樹状細胞 (DC) の全周波数を計算し、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) の助けを借りてプロットした。図4に示されている結果は、CD40 ADCが、DC活性化のインビボでの抑制において、親のアンタゴニスト抗体又はイソタイプADCよりもより大きな効力を示すことを実証している。

【0363】

[実施例 F] 遅延型IV過敏症モデルにおける抗マウスCD40 ADCの活性

抗マウスCD40 ADCを急性遅延型 - IV過敏症 (DTH) モデルにおいて評価した。皮膚のT細胞駆動性急性炎症性応答を増感したタンパク質抗原 (BSA) への再曝露により誘発させた。抗マウスCD40 ADCの効力を足の腫れを阻害する能力により測定した。

【0364】

C57BL/6 雌のマウスに、- 1日目に、(1) 対照1としてのmCD40 mAb ; (2) 対照2としての実施例12 - 加水分解型イソタイプ (Ab = 抗破傷風トキソイド、マウスイソタイプ) (n = 4) ; 又は(3) ADCとしての実施例12 - 加水分解型 (マウス) (n = 4) を腹腔内投薬した。0日目、CFA H37Ra (Becton Dickinson、Cat # 231131) 中で乳化させた200 µg のメチル化BSA (SIGMA - Aldrich、Cat # 1009) を使用して、免疫化を介してマウスを増感させた。7日目、両後足のベースライン厚さを測定した。右のフットパッドにはリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) 中100 µg のmBSAを細菌投与し、左のフットパッドはPBS 単独で処理した。細菌投与後24時間の時点で、後足を、Dyer スプリングキャリパ (Dyer 310 - 115) を使用して足の腫れについて評価した。厚さの変化をベースラインと比べて図5Aにプロットする。足の腫れの測定後、マウスにACTHを1mpk IPで注入し、ACTH後30分の時点で最終的に出血させた。血漿を収集し、P1NP、コルチコステロン、遊離ステロイド、及び大分子レベルについて分析した。図5Aのデータは、T細胞媒介性炎症をインビボでより強力に阻害するCD40 ADCの効力が、親のアンタゴニスト抗体又は非標的ADC単独の場合よりも増強したことを実証している。

【0365】

抗マウスCD40 又はイソタイプ (Ab = 抗オボアルブミン、マウスイソタイプ) への実施例28 - コンジュゲート型 (マウス) からなる抗マウスCD40 ADCの活性もまた、上に示された手順に従いDTHアッセイにおいて評価した。図5Bは、T細胞媒介性炎症をインビボで阻害するCD40 ADCの効力が、親のアンタゴニスト抗体又は非標的ADC単独の場合よりも増強したことを実証している。

【0366】

[実施例 G] 炎症のDTHモデルにおけるステロイドバイオマーカー

1. 血漿P1NP

血漿P1NPの定量化は、タンパク質トリプシン消化に基づくLC/MSプラットフォーム上で行った。血漿試料を部分的に沈殿させ、MeCN/0.1M炭酸水素アンモニウム/DTT混合物を添加することにより完全に還元させた。上清を収集し、ヨード酢酸を添加することによりアルキル化した。アルキル化したタンパク質をトリプシンで分解し、生成したトリプシンペプチドをLC/MSで分析した。

【0367】

ウマ血清 (非干渉性代用マトリックス) に加えた合成トリプシンのペプチドを使用することにより標準曲線物質を生成した。安定した同位体標識フランキングペプチド (トリプシンペプチドの両末端上の3~6アミノ酸伸長) を、消化効率及びLC/MS注入の両方を正規化するためのMeCN/DTTタンパク質沈殿混合物に加える内部標準として使用

10

20

30

40

50

した。Columnex Chromenta BB-C18、2.1×150 mm、5 μmカラムをクロマトグラフィー分離に使用した。移動相Aは、Milli Q HPLC水中0.1%ギ酸であり、移動相BはMeCN中0.1%ギ酸であった。2%の移動相Bから65%移動相Bまでの線型勾配を0.6~3分間適用した。全作動時間は0.45 mL/分の流量で8分間であった。AB Sciex 4000 Qtrap質量分析器をポジティブMRMモードで使用して、700 のソース温度でP1NPペプチドを定量化した。

【0368】

2. 放出された遊離ステロイド及び内因性コルチコステロン

ステロイドの標準曲線物質を、0.03 nM~0.1 μMの最終濃度、8つの異なる濃度レベルで、マウス血漿中で調製した。最終コルチコステロン濃度0.3 nM~1 μMの範囲のコルチコステロン標準曲線物質を、リン酸緩衝液生理食塩水(PBS)中の70 mg/mLウシ血清アルブミン溶液に調製した。0.1%ギ酸を有する160 μLのMeCNの溶液を、40 μLの血漿研究試料又は校正標準液に加えた。上清を蒸留水で希釈し、30 μLの最終試料溶液をLC/MS分析用に注入した。

【0369】

放出された遊離ステロイド及びコルチコステロンの定量化を、ポジティブモードで作動するエレクトロスプレーイオン化ソースとインターフェイス接続されたShimadzu AC20 HPLCシステムに接続しているAB Sciex 5500トリプル四重極質量分析計で行った。Waters XBridge BEH C18、2.1×30 mm、3.5 μmカラムをクロマトグラフィー分離に使用した。移動相AはMilli Q HPLC水中0.1%ギ酸であり、移動相BはMeCN中0.1%ギ酸であった。2%の移動相Bから98%の移動相Bへの線型勾配を0.6~1.2分間適用した。全作動時間は流量0.8 mL/分で2.6分であった。質量分析器を、ポジティブMRMモードで、ソース温度700 で作動した。表20のデータは、DTHモデルにおけるADCの処置がステロイドバイオマーカー、P1NP及びコルチコステロンの血清レベルに有意に影響しないことを実証している。

【0370】

【表21】

表20. 抗マウス CD40 ADC 活性のステロイドバイオマーカーに対する作用

対照/ADC	n	P1NP (ng/ml ± SD)	コルチコステロン (ng/ml ± SD)
ビヒクル	4	1294±183	292.832±40
実施例 12-加水分解型(マウス), 10 mpk	4	1096.4±306	312.526±46
実施例 12-加水分解型(マウス), 3 mpk	4	1486.6±313	332.304±27
実施例 12-加水分解型(マウス), 1 mpk	4	1255.4±318	303.742±40
実施例 12-加水分解型(マウス), 0.3 mpk	4	1736±197	271.182±83
実施例 12-加水分解型(マウス), 0.1 mpk	4	1311.2±418	282.856±43

【0371】

[実施例 H] コラーゲン誘発関節炎(CIA)における抗マウスCD40免疫コンジュゲートの活性

実施例 6 - 加水分解型(マウス)ADCの疾患に影響を与える能力を、関節炎のコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルにおいて評価した。

【0372】

これらの実験において、雄のDBA/1JマウスをJackson Labs (Bar Harbor, ME) から入手した。マウスは、週齢6～12週で使用した。すべての動物は、定温及び定湿気で、12時間の明暗サイクル下で維持し、げっ歯類固形飼料 (Lab Diet 5010 PharmaServ, Framingham, MA) 及び水を自由に摂取できるようにした。AbbVieはAAALAC (実験動物ケア評価認証協会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)) 正式認可を受け、すべての手順は動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)) により承認され、担当獣医によりモニターされた。体重及び状態はモニターされ、動物は>20%体量の減少を示した場合安楽死させた。

10

【0373】

雄のDBA/1Jマウスは、0.1N酢酸に溶解した100µgのII型ウシコラーゲン (MD Biosciences) 及び200µgの加熱不活性結核菌H37Ra (フロイント完全アジュバント、Difco, Laurence, KS) を含有する100µLの乳濁液を、尾の底部に皮内 (i.d.) 投与することで免疫を付けた。コラーゲンでの免疫化から21日目に、マウスにIPリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) 中の1mgのZymosan A (Sigma, St. Louis, MO) で追加免疫を付けた。この強化後、1週間当たり3～5回関節炎についてマウスをモニターした。Dyerスプリングキャリパ (Dyer 310-115) を使用して足の腫れについて後足を評価した。

20

【0374】

24日目～28日目の間に、疾患の第1の臨床徴候があった時点でマウスを登録し、同等の関節炎重症度を有する群になるよう分配した。早期療法的治療を登録の時点で開始した。

【0375】

抗マウスCD40アンタゴニスト抗体を10mg/kgで、又は0.9%生理食塩水中実施例6-加水分解型(マウス)ADC(n=4)を動物に腹腔内投与した。投与後24及び72時間の時点で、尾の切り傷を入れて、抗体曝露量のために血液を収集した。最終時間点において組織病理学用に足を収集した。最終時間点において、完全な血算のために、心臓穿刺により血液を収集した (Sysmex XT-2000iV)。統計的有意性をANOVAで決定した。実施例6-加水分解型イソタイプ (Ab=抗破傷風トキソイド、マウスイソタイプ) (n=4) 及び親の抗mCD40 mAbを対照1及び2として使用した。図6に示されている結果は、単回用量の抗マウスCD40ステロイドADCが、対照1及び2と比較して、約6週間の間、足の腫れの回復を介して延長した作用期間を示すことができることを実証している。

30

【0376】

参照による組み込み

詳細な説明及び実施例において参照された、特許及び公開出願を含むすべての公開は、これら全体が本明細書で参照により組み込まれている。

【0377】

他の実施形態

前述の記載は、本開示のある特定の非限定的実施形態が記載されている。当業者であれば、この記載に対する様々な変化及び修正が、本開示の趣旨又は範囲から逸脱することなく、以下の特許請求の範囲で定義されているように作製され得ることを認識している。

40

【図 1 A】

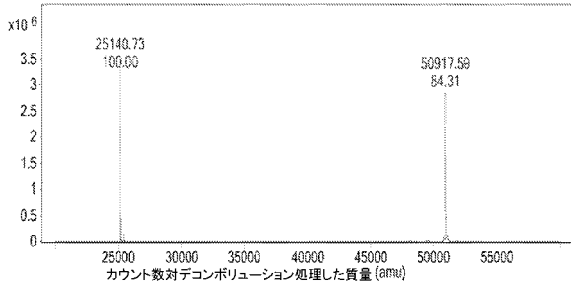


FIG. 1A

【図 1 B】

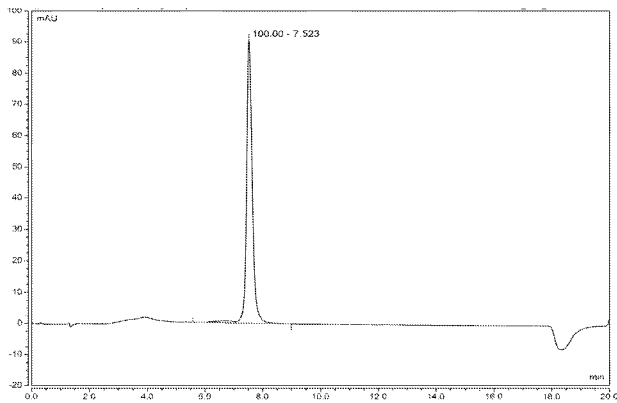


FIG. 1B

【図 1 C】

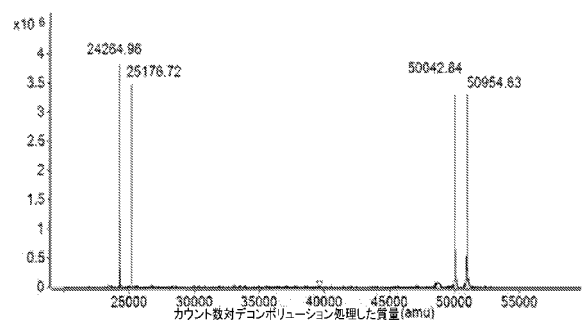


FIG. 1C

【図 1 D】

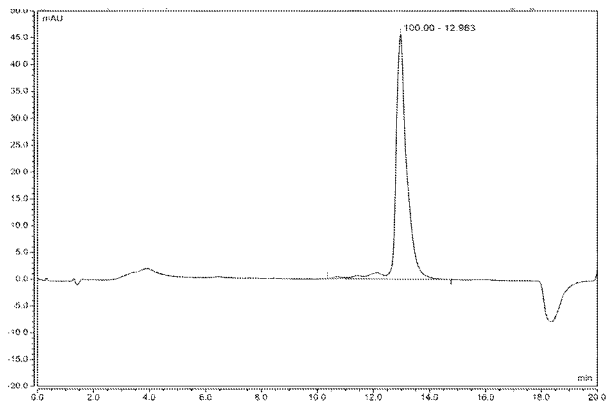


FIG. 1D

【図 1 E】

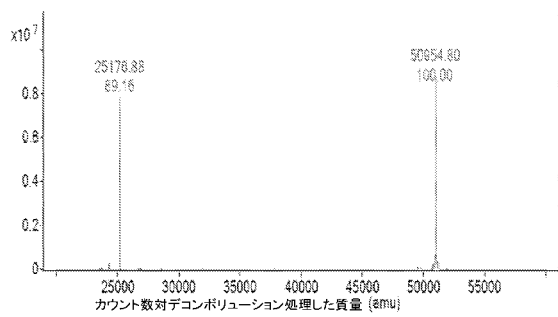


FIG. 1E

【図 3】

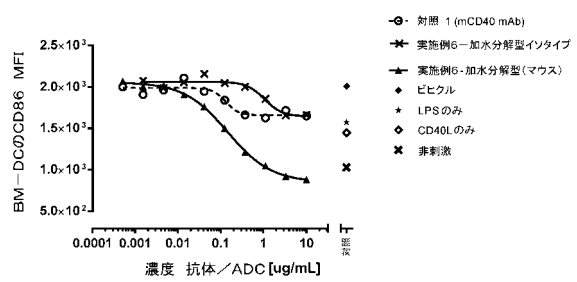


FIG. 3

【図 2】

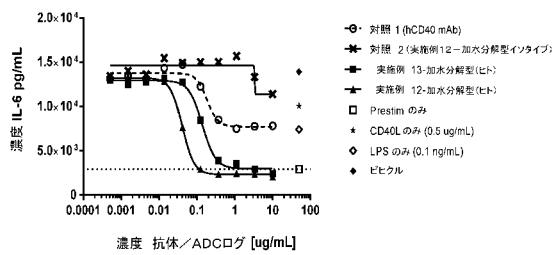


FIG. 2

【図 4】

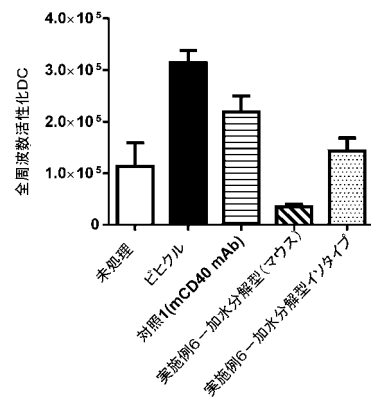


FIG. 4

【 図 5 A 】

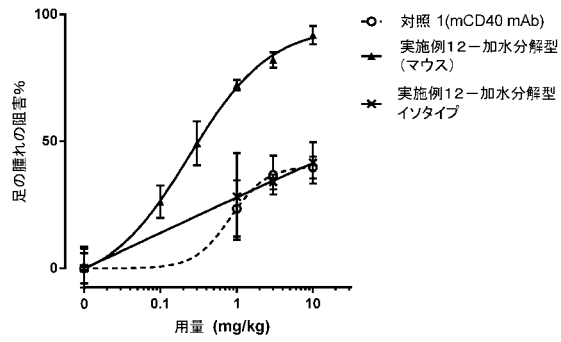


FIG. 5A

【 図 5 B 】

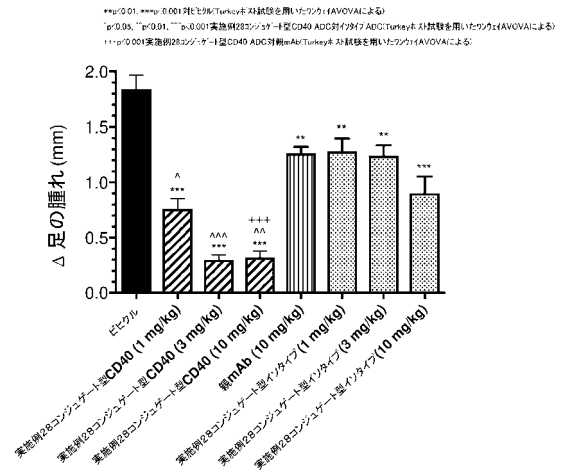


FIG. 5B

【 図 6 】

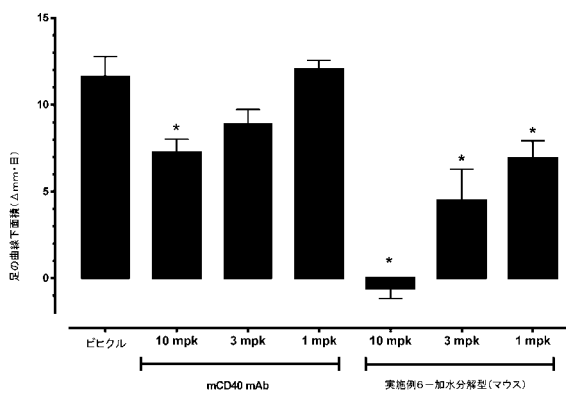


FIG. 6

【配列表】

2021504430000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB18/59480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 31/585, 39/395; C07K 16/28 (2019.01)
CPC - A61K 31/585, 39/3955; C07K 16/2878

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0347850 A1 (ABBVIE INC.) 01 December 2016; abstract; paragraphs [0009], [0015]	1-2, 3/1-2, 4/1-2, 5/1-2, 18-24, 28-31
A	US 2017/0233483 A1 (APEXIGEN, INC.) 17 August 2017; paragraphs [0019], [0136]	1-2, 3/1-2, 4/1-2, 5/1-2, 18-24, 28-31
A	US 2011/0182828 A1 (ANTHES, JC et al.) 28 July 2011; paragraphs [0011]-[0021]	1-2, 3/1-2, 4/1-2, 5/1-2, 18-24, 28-31
A	US 2014/0336160 A1 (PFIZER INC.) 13 November 2014; abstract; paragraph [0241]	1-2, 3/1-2, 4/1-2, 5/1-2, 18-24, 28-31
A	US 2016/0129128 A1 (PHARMA MAR, S.A.) 12 May 2016; paragraphs [0013]-[0014]	1-2, 3/1-2, 4/1-2, 5/1-2, 18-24, 28-31

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2019 (14.03.2019)

Date of mailing of the international search report

01 APR 2019

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB18/59480

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB18/59480

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-17, 25-27, 32-37
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (72) 発明者 マクファーソン, マイケル・ジェイ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01431、アッシュビー、ビルズベリー・ロード・287
- (72) 発明者 ワエゲル, ウェンディ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01506、ブルックフィールド、ライス・コーナー・ロード・7
- (72) 発明者 ブライアント, ショーン・エイチ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01603、ウースター、マーブル・ストリート・30
- (72) 発明者 エルナンデス, アクセル, ジュニア
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01507、チャールトン、ローリー・レーン・14
- (72) 発明者 イエレ, クレア・エル
アメリカ合衆国、コロラド・80218、デンバー、ノース・エマーソン・ストリート・1050、アパートメント・4
- (72) 発明者 マービン, クリストファー・シー
アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレイズレイク、ブラクストン・ウェイ・242
- (72) 発明者 ペルン, オリビア・エイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94568、ダブリン、ストリンガム・ウェイ・2836
- (72) 発明者 サントラ, リング・シー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01545、シュルーズベリー、ソロー・サークル・7
- (72) 発明者 ワン, ルー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01532、ノースボロー、ストラットン・ウェイ・14
- (72) 発明者 ワン, ルー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01581、ウェストボロー、ニップマック・ドライブ・12

F ターム (参考) 4B064 AG27 CC24 DA01

4C076 AA95 EE59

4C085 AA25 BB11 CC02 DD52 DD62 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 DA11 MA01 MA04 MA05 NA13 ZB07 ZB11

4H045 AA11 AA30 BA10 BA72 CA40 DA76 EA20 FA74