

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

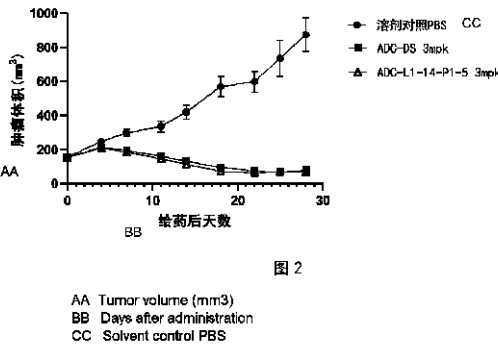
(11)公表番号
特表2025-516381
(P2025-516381A)

(43)公表日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68		4 C 0 7 6
C 0 7 D	491/22 (2006.01)	C 0 7 D	491/22	C S P	4 C 0 8 5
A 6 1 K	31/437(2006.01)	A 6 1 K	31/437	Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全185頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2024-566849(P2024-566849)	(71)出願人	524052561	最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和5年5月11日(2023.5.11)		ハイナン シムセレ ザイミン ファーマ		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月12日(2024.11.12)		シューティカル カンパニー リミテッド		
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/093503		中華人民共和国 5 7 0 3 1 1 ハイナン		
(87)国際公開番号	WO2023/217227		ハイコウ シューイン ディストリクト		
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)		ヤオグー イーホン ロード ナンバー 2 0		
(31)優先権主張番号	202210515898.0	(74)代理人	100147485	最終頁に続く	
(32)優先日	令和4年5月12日(2022.5.12)		弁理士 杉村 憲司		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	230118913		
(31)優先権主張番号	202210999585.7		弁護士 杉村 光嗣		
(32)優先日	令和4年8月19日(2022.8.19)	(74)代理人	100181847		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		弁理士 大島 かおり		
(31)優先権主張番号	202310406469.4	(72)発明者	フー ヤーユエン	最終頁に続く	
			中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハ		
			イ ブードン ニュー ディストリクト フ		

(54)【発明の名称】 カンプトテシン系誘導体及びリガンドー薬物複合体

(57)【要約】
本開示は、構造新規のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩に関し、具体的には、本開示は、一般構造式がP c - (L - D) _nであるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、その製造方法、上記複合体を含む医薬組成物、及び腫瘍の治療におけるその用途を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

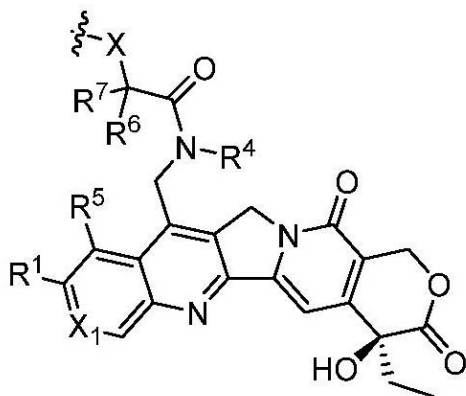
一般構造式が $Pc - (L - D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩であって、そのうち、

Pc は、リガンドユニットであり、

L は、リンカーユニットであり、

D は、下記式 ($D-I$) で示される薬物ユニットであり、

【化 1】



(D-I)

10

20

そのうち、

X は、 NH 又は O から選ばれ、

R^1 は、ハロゲン、 CN 、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は $C_2 - C_6$ アルキニル基から選ばれ、前記 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は $C_2 - C_6$ アルキニル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^{a1} で置換され、

X_1 は、 CR^2 又は N から選ばれ、

R^2 は、 H 、ハロゲン、 CN から選ばれ、又は R^1 、 R^2 は、それらに連結している原子と共に 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基を形成し、前記 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^{a2} で置換され、

30

R^4 は、 H 、 $C_1 - C_3$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は 4 ～ 7 員ヘテロシクリル基から選ばれ、前記 $C_1 - C_3$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は 4 ～ 7 員ヘテロシクリル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^{a4} で置換され、

R^5 は、 H 、ハロゲン、 CN 、 NH_2 又は NO_2 から選ばれ、或いは R^1 、 R^5 は、それらに連結している原子と共に 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基、5 ～ 6 員ヘテロアリール基又は $C_5 - C_7$ シクロアルケニル基を形成し、前記 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基、5 ～ 6 員ヘテロアリール基又は $C_5 - C_7$ シクロアルケニル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^{a5} で置換され、

R^6 は、 H 又は $C_1 - C_3$ アルキル基から選ばれ、

R^7 は、 H 、 $C_1 - C_3$ アルキル基又は $C_3 - C_6$ シクロアルキル基から選ばれ、或いは R^6 、 R^7 は、それらに連結している C 原子と共に $C_3 - C_6$ シクロアルキル基を形成し、

40

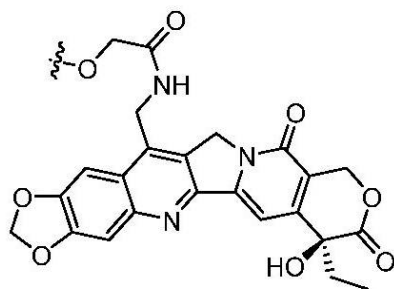
前記 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^{a7} で置換され、各 R^{a1} 、 R^{a2} 、 R^{a4} 、 R^{a5} 、 R^{a7} は、独立的に D 、ハロゲン、 CN 、 $=O$ 、 OH 、 NH_2 、 $C_1 - C_3$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は 4 ～ 7 員ヘテロシクリル基から選ばれ、前記 OH 、 NH_2 、 $C_1 - C_3$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は 4 ～ 7 員ヘテロシクリル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^b で置換され、各 R^b は、独立的にハロゲン、 CN 、 $=O$ 、 $C_1 - C_3$ アルキル基、 OH 、 O ($C_1 - C_3$ アルキル基)、 NH_2 、 NH ($C_1 - C_3$ アルキル基) 又は N ($C_1 - C_3$ アルキル基) $_2$ から選ばれ、

条件として、i) R^1 がメチル基から選ばれ、 R^2 が F から選ばれる場合、 R^6 、 R^7 は

50

、それらに連結しているC原子と共にシクロプロピル基を形成し、i i) XがNHから選ばれる場合、R⁵はHから選ばれず、i i i) 式(D-I)で示される化合物は、

【化2】



10

を含まず、

且つ、nは1～16の実数である、

リガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項2】

R¹は、ハロゲン、C₁～C₃アルキル基、C₃～C₆シクロアルキル基又はC₂～C₃アルキニル基から選ばれる、

請求項1に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項3】

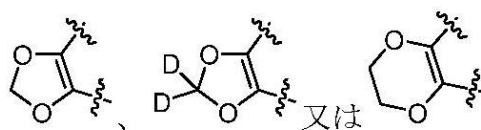
R²は、H、ハロゲン、CNから選ばれ、又はR¹、R²は、それらに連結している原子と共に5～6員ヘテロシクリル基を形成し、前記5～6員ヘテロシクリル基は、環原子として1又は2個の酸素原子を含み、前記5～6員ヘテロシクリル基は、任意選択的に1つ又は複数のD原子で置換される、

請求項1又は2に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項4】

R²は、H、F又はClから選ばれ、或いはR¹、R²は、それらに連結している原子と共に

【化3】



30

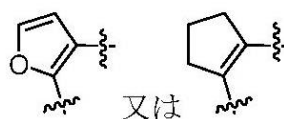
を形成する、

請求項1又は2に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項5】

R⁵は、H、Cl、F、NH₂又はNO₂から選ばれ、或いはR¹、R⁵は、それらに連結している原子と共に

【化4】



40

を形成する、

請求項1～4の何れか一項に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項6】

R⁴は、H又はC₁～C₃アルキル基から選ばれる、

50

請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 7】

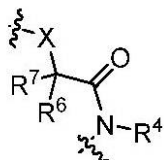
R^7 は、 H 、 $C_1 - C_3$ アルキル基又は任意選択的に 1 つ又は複数の D で置換された $C_3 - C_6$ シクロアルキル基から選ばれ、或いは R^6 、 R^7 は、それらに連結している C 原子と共に $C_3 - C_6$ シクロアルキル基を形成する、

請求項 1 ～ 6 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 8】

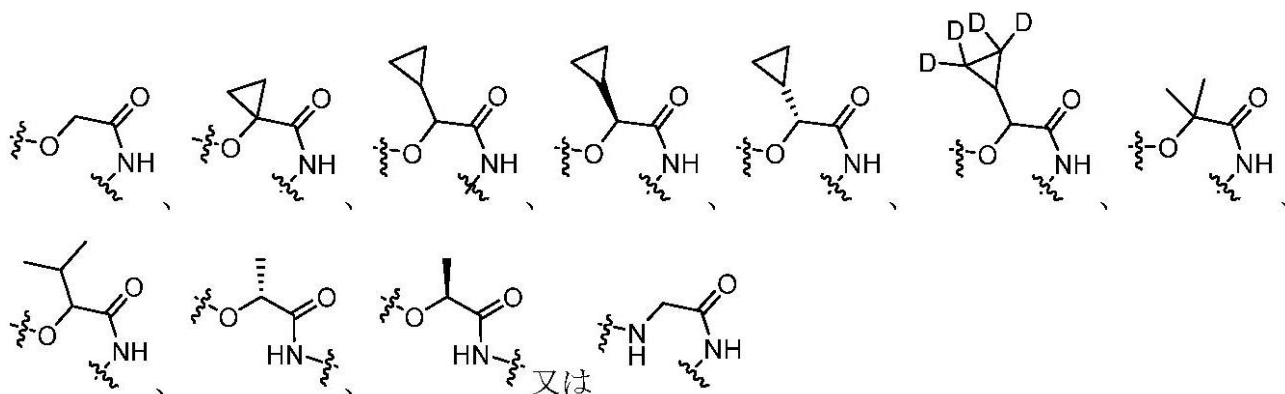
構造ユニット

【化 5】



は、

【化 6】



から選ばれる、

請求項 1 ～ 7 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 9】

式 (D-I) で示される薬物ユニットは、式 (D-I a) で示される薬物ユニットから選ばれ、

10

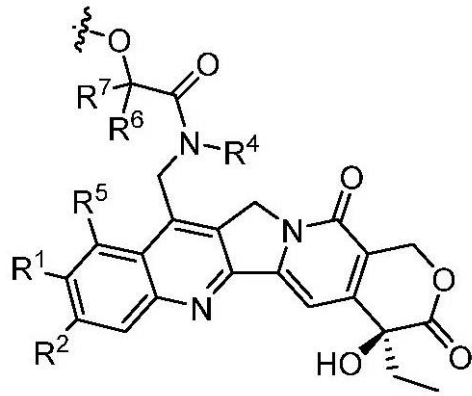
20

30

40

50

【化 7】



10

(D-I a)

そのうち、R¹、R²、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷は、請求項1～8の何れか一項で定義される通りである、

請求項1～8の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 10】

式 (D-I) で示される化合物は、以下に示される化合物：

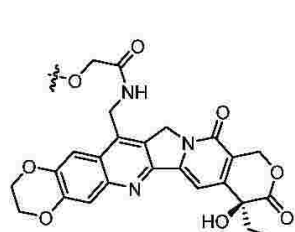
20

30

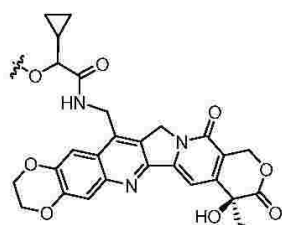
40

50

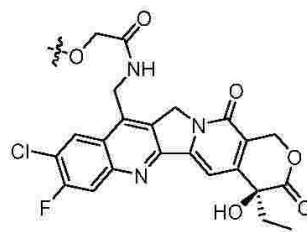
【化 8】



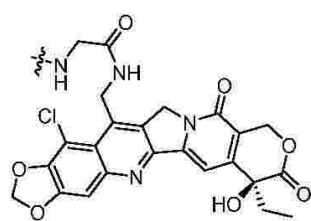
1'



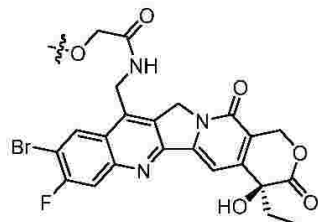
2'



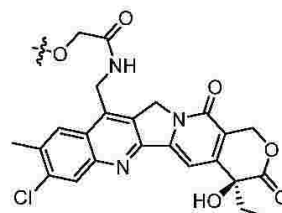
3'



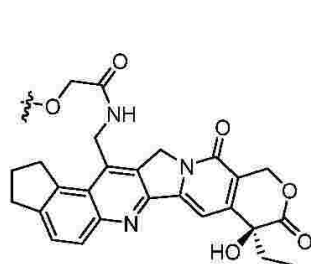
4'



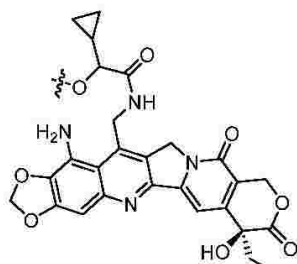
5'



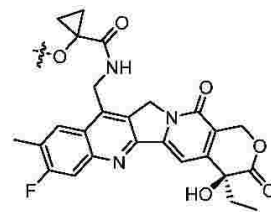
6'



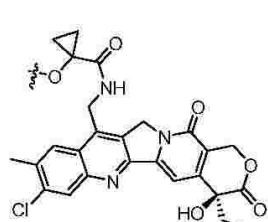
7'



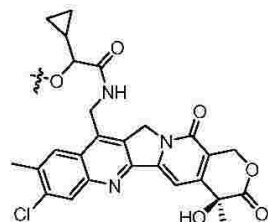
8'



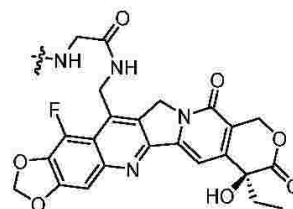
9'



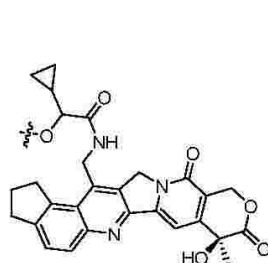
10'



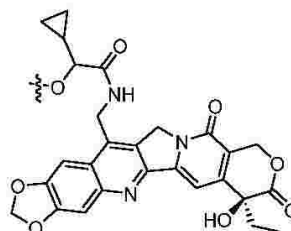
11'



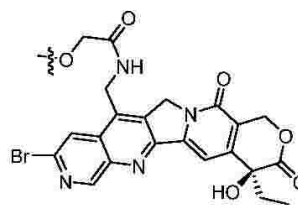
12'



13'



14'



15'

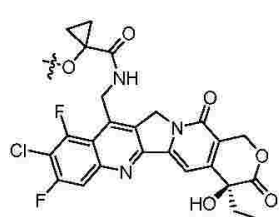
10

20

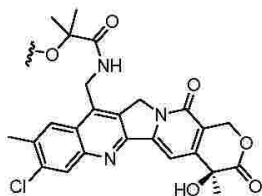
30

40

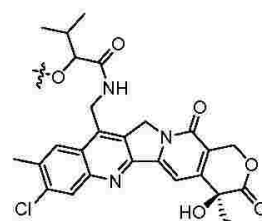
50



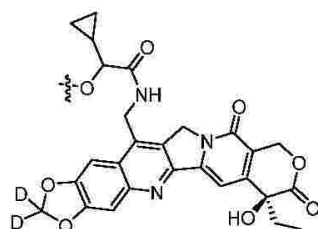
16'



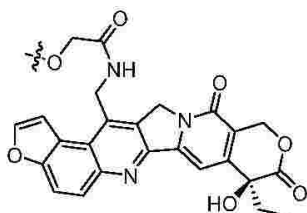
17'



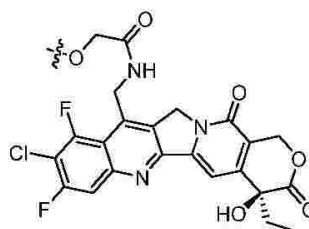
18'



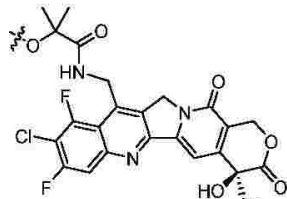
19'



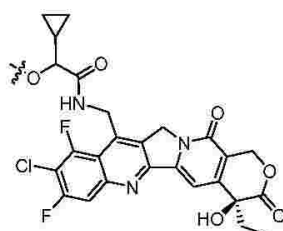
20'



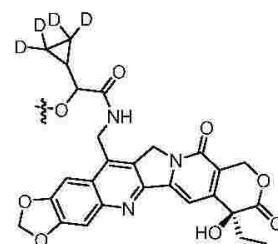
21'



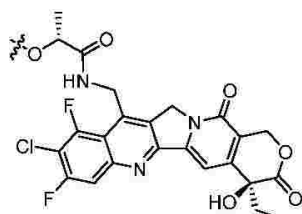
22'



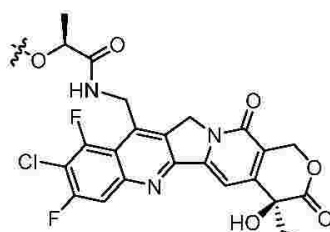
23'



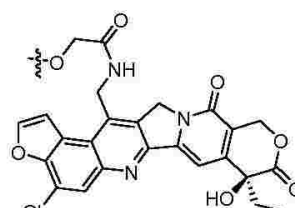
24'



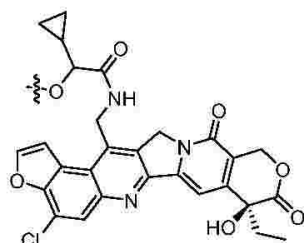
25'



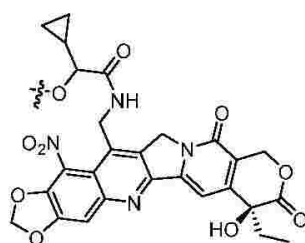
26'



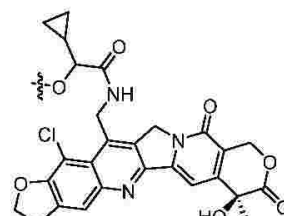
27'



28'



29'



30'

10

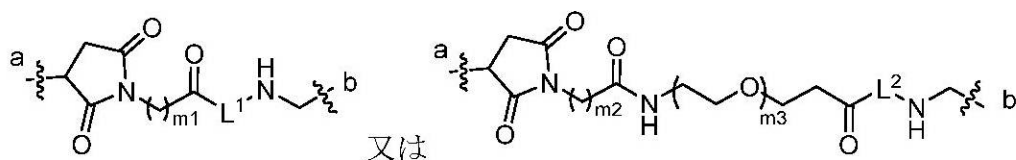
20

30

40

50

【化 9】



から選られ、その a 末端はリガンドユニット P c に共有結合しており、b 末端は薬物ユニット D に共有結合しており、そのうち、m1、m2 は、それぞれ独立的に 2～8 の整数から選られ、m3 は、1～16 の整数から選られ、L¹、L² は、それぞれ独立的に 1～8 個のアミノ酸からなるペプチド残基から選られ、前記ペプチド残基は、更に任意選択的にハロゲン、CN、=O、C₁－C₆アルキル基、OH、O（C₁－C₆アルキル基）、NH₂、NH（C₁－C₆アルキル基）、N（C₁－C₆アルキル基）₂、C₃－C₆シクロアルキル基及び 4～7 員ヘテロシクリル基のうちの 1 つ又は複数の置換基で置換される、請求項 1～10 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

10

【請求項 12】

前記 L¹、L² は、それぞれ独立的に 2、3 又は 4 個のアミノ酸からなるペプチド残基から選られ、前記ペプチド残基は、更に任意選択的にハロゲン、CN、=O、C₁－C₆アルキル基、OH、O（C₁－C₆アルキル基）、NH₂、NH（C₁－C₆アルキル基）、N（C₁－C₆アルキル基）₂、C₃－C₆シクロアルキル基及び 4～7 員ヘテロシクリル基のうちの 1 つ又は複数の置換基で置換される、

20

請求項 11 に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 13】

前記 L¹ は、Gly－Gly－Phe－Gly テトラペプチド残基又は Ala－Ala－Ala トリペプチド残基であり、前記 L² は、Gly－Gly－Phe－Gly テトラペプチド残基又は Val－Lys ジペプチド残基である、

請求項 11 又は 12 に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 14】

m1 は 5 から選られ、m2 は 2 から選られ、m3 は 8 から選られる、

30

請求項 11～13 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

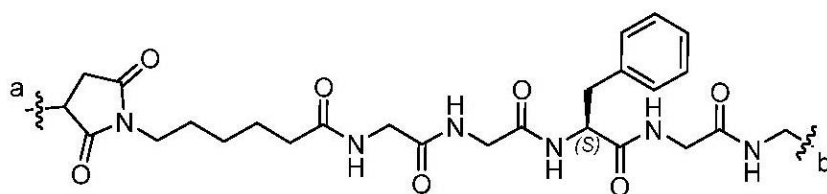
【請求項 15】

リンカーユニット L は、

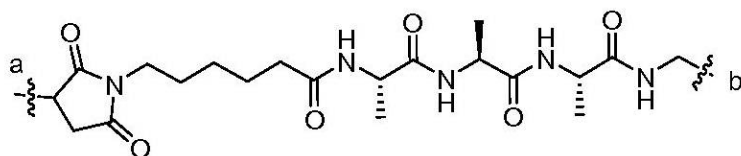
40

50

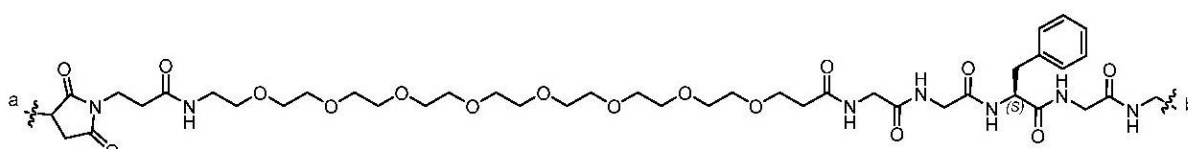
【化 1 0】



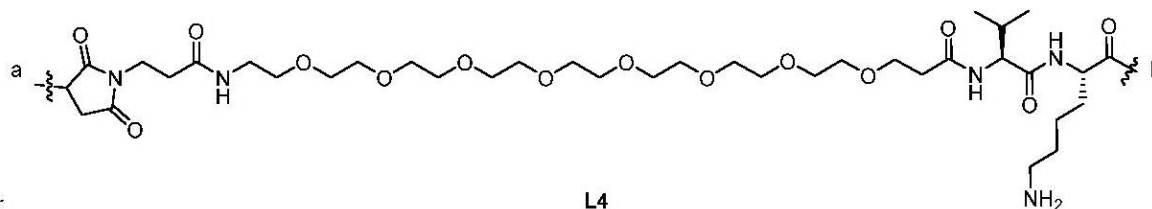
L1



L2



L3



L4

又は

から選られ、その a 末端はリガンドユニット P c に共有結合しており、b 末端は薬物ユニット D に共有結合している、
請求項 1 1 ~ 1 4 の何れか一項に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 6】

前記リガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩は、下記リガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩：

10

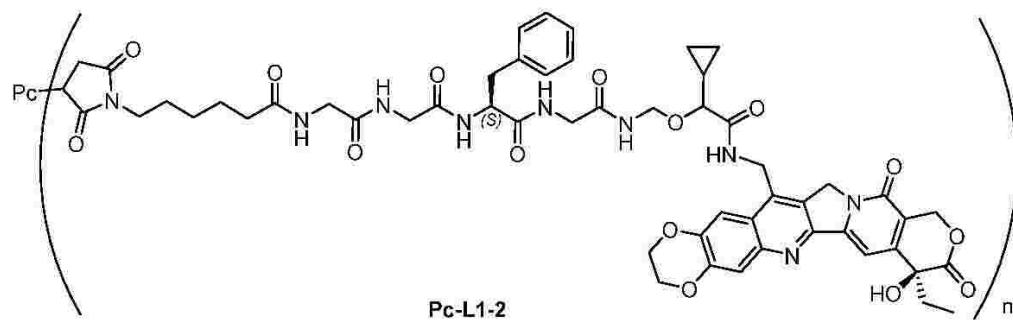
20

30

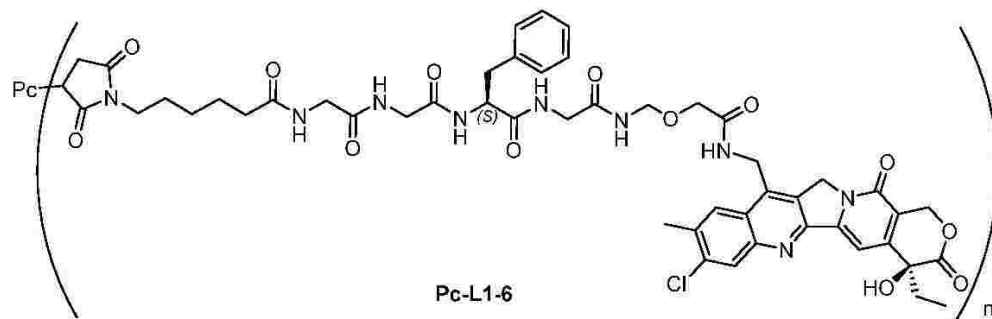
40

50

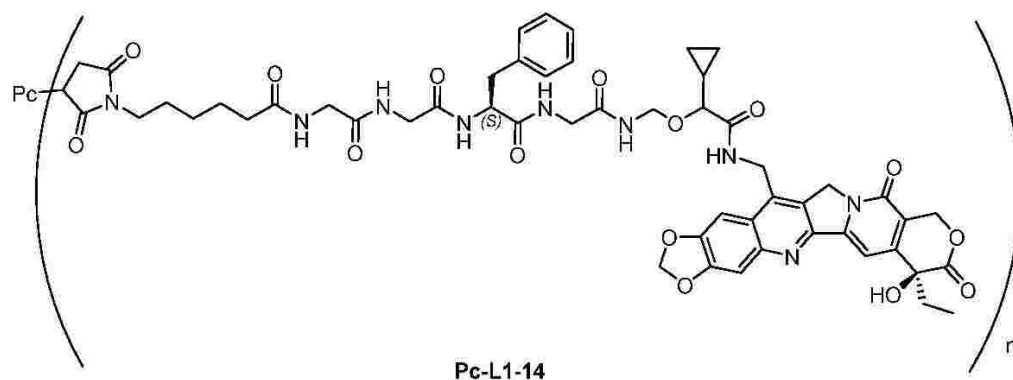
【化 1 1】



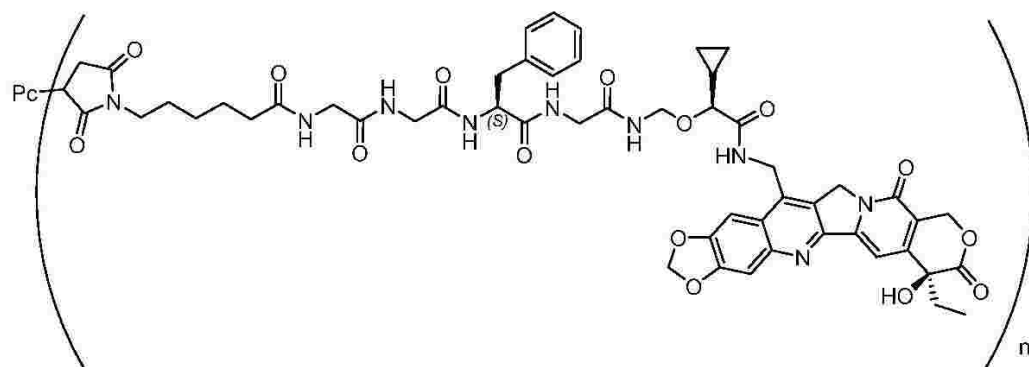
10



20



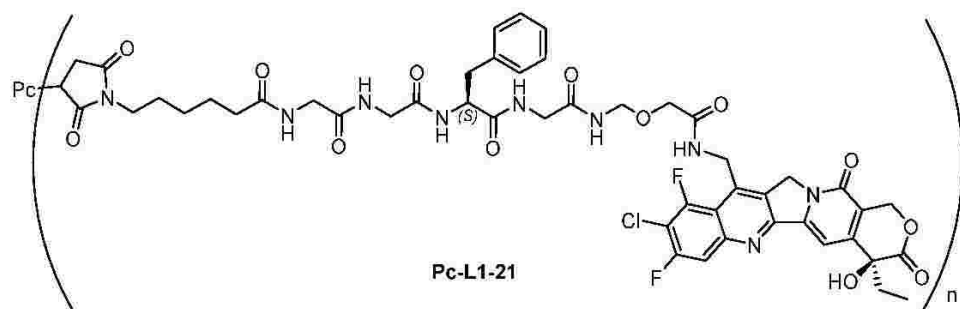
30



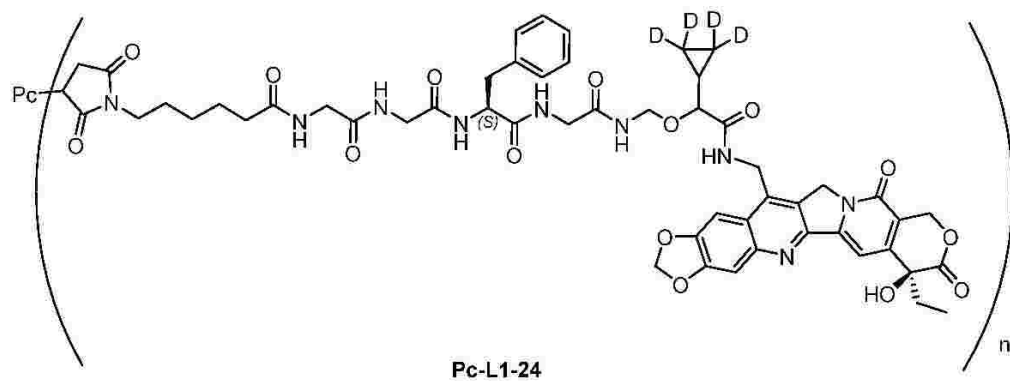
40

50

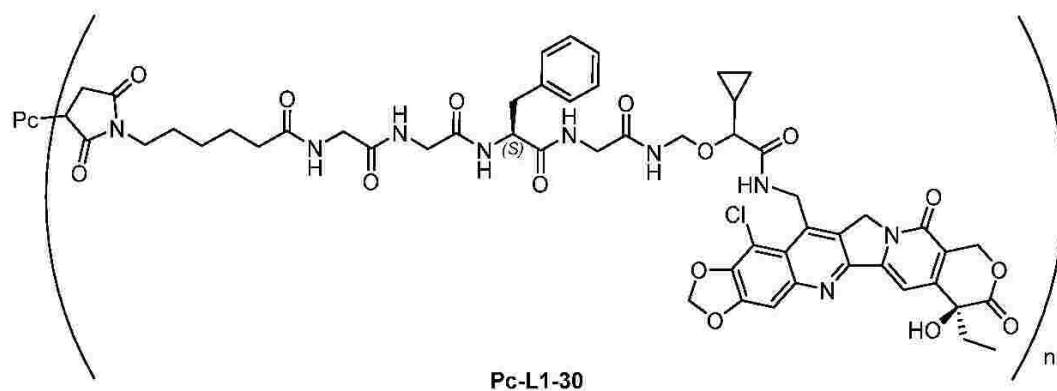




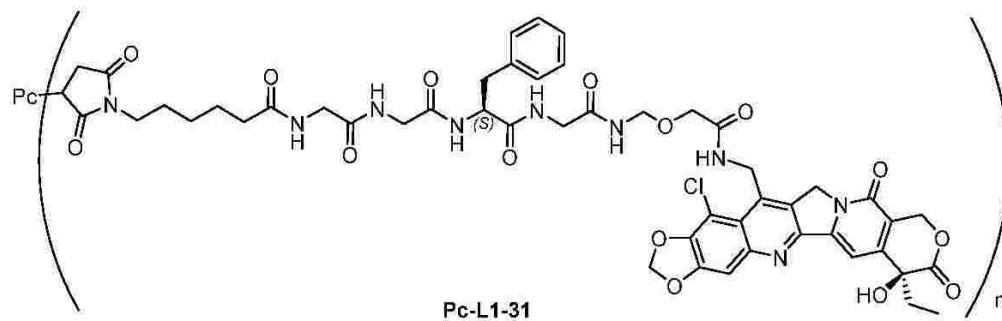
10



20

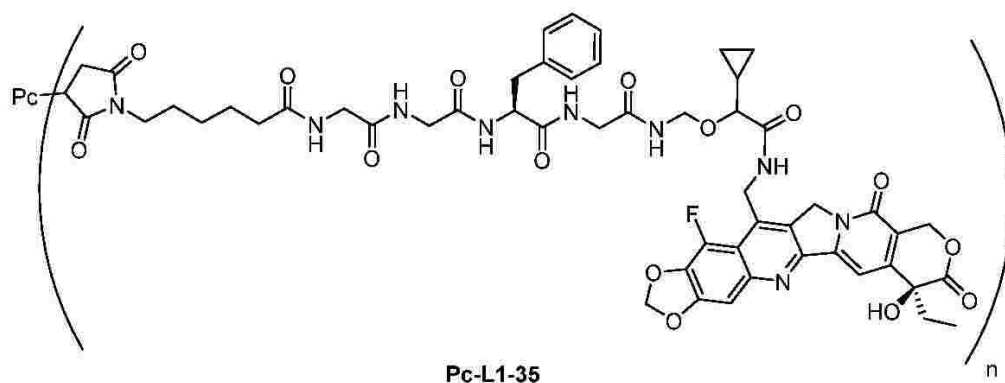


30

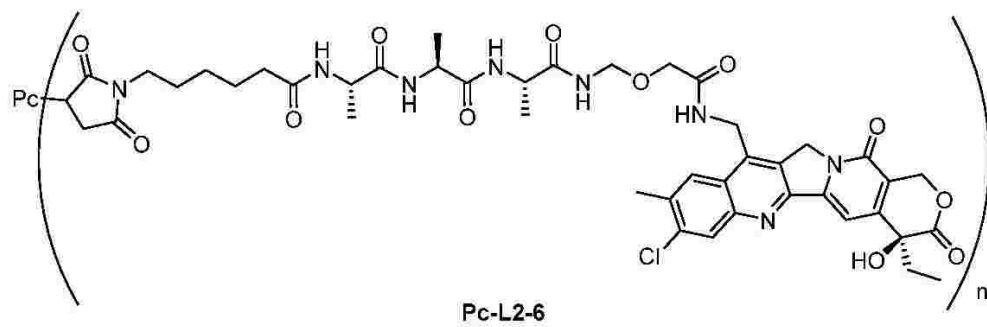


40

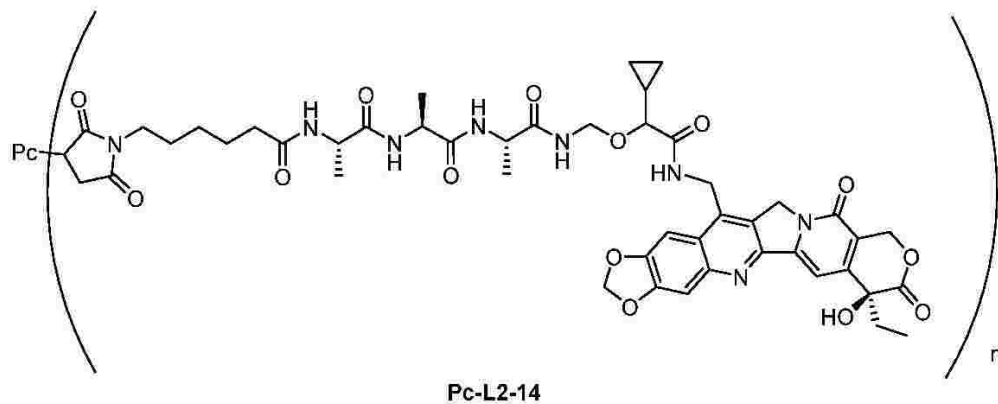
50



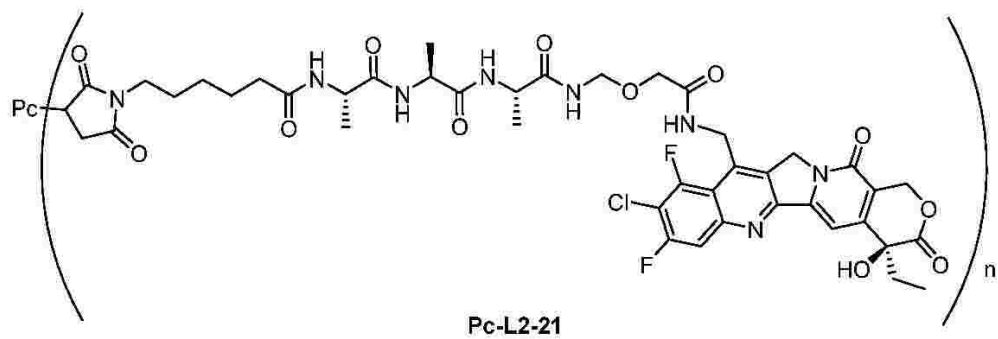
10



20

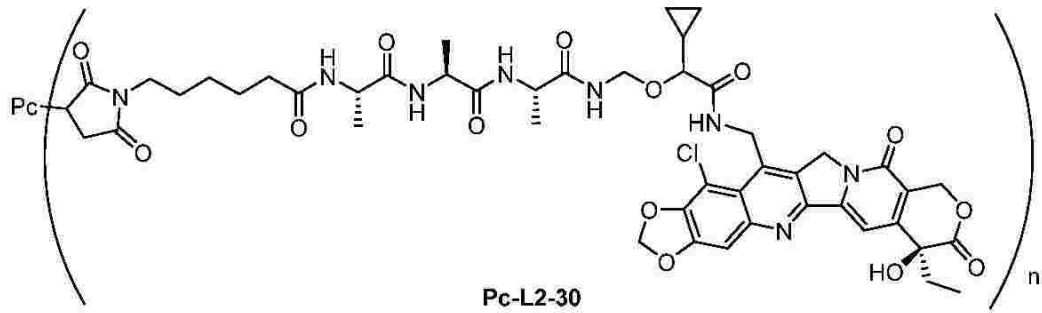


30

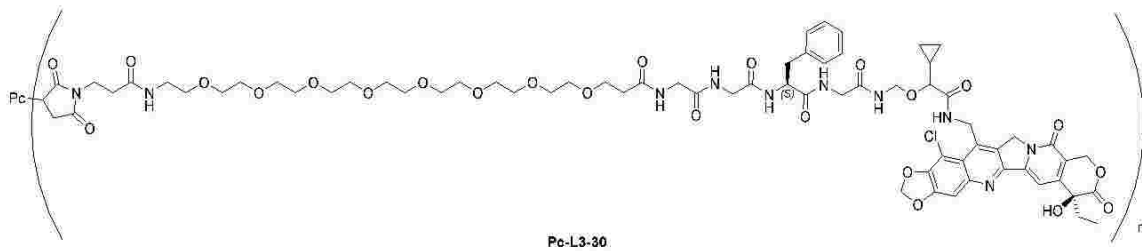
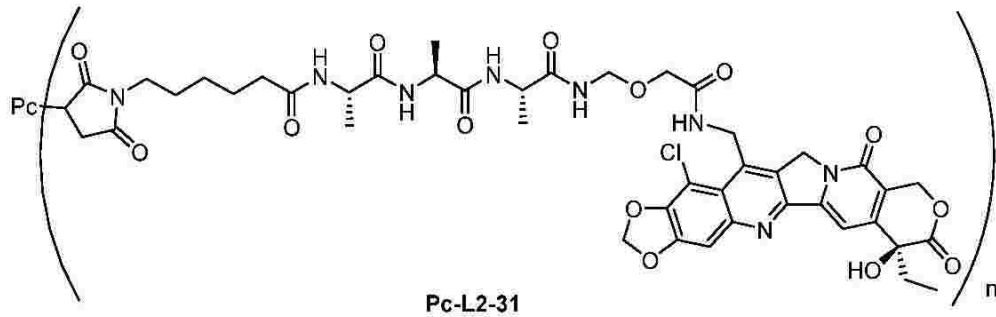


40

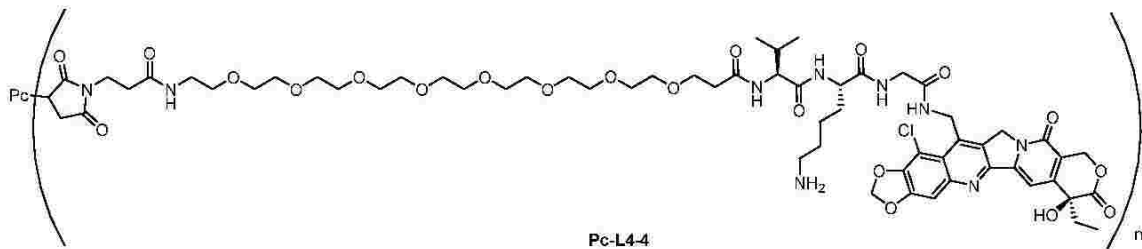
50



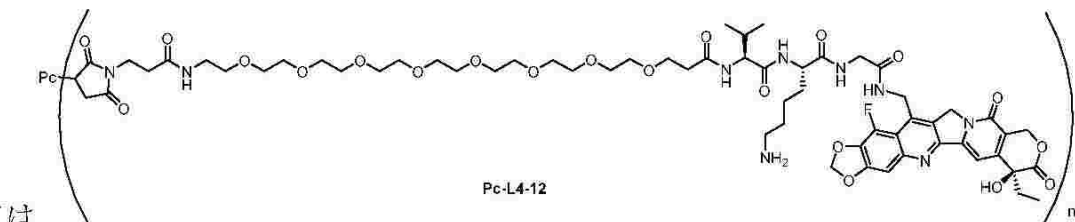
10



20



30



又は

40

から選られ、

そのうち、Pcとnは、請求項1で定義される通りである、

請求項1～15の何れか一項に記載のリガンド-薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項17】

前記リガンドユニットPcは、ポリペプチド、抗体又はその抗原結合断片から選ばれる、請求項1～16の何れか一項に記載のリガンド-薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項18】

50

前記リガンドユニットPcは、HER2、p95HER2、HER3、CD3、CD16、ROR1、DLL3、CDH6、CD70、CD5、CD20、BCMA、EGFR、VEGF及びLIV-1からなる群より選ばれる1つ又は複数の抗原に特異的に結合することができる、

請求項1～17の何れか一項に記載のリガンド-薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項19】

前記Pcは、HER2、p95HER2、CDH6、ROR1若しくはLIV-1に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であり、前記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域(VH)又は／及び軽鎖可変領域(VL)を含み、選択可能的に、そのうち、(1)前記重鎖可変領域は、配列番号1、3、19、21、37、46、54、56、71、80、82若しくは84に示されるVHに含まれるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、又は／及び前記軽鎖可変領域は、配列番号2、4、20、22、38、47、55、57、72、81、83若しくは85に示されるVLに含まれるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み、或いは(2)前記重鎖可変領域又は／及び前記軽鎖可変領域は、群(1)に記載のHCDR1～3又は／及びLCDR1～3中の各CDRと比べて、少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列、又は多くとも3つの挿入、欠失若しくは置換突然変異が生じるアミノ酸配列を含む、

請求項17又は18に記載のリガンド-薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項20】

前記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域(VH)又は／及び軽鎖可変領域(VL)を含み、前記重鎖可変領域は、HCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、又は／及び前記軽鎖可変領域は、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み、そのうち、前記HCDR1～3又は／及び前記LCDR1～3は、

(1)前記HCDR1～3は、配列番号7～9であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号10～12であり、

(2)前記HCDR1～3は、配列番号13～15であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号16～18であり、

(3)前記HCDR1～3は、配列番号23～25であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号26～28であり、

(4)前記HCDR1～3は、配列番号29～31であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号32～34であり、

(5)前記HCDR1～3は、配列番号40～42であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号43～45であり、

(6)前記HCDR1～3は、配列番号48～50であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号51～53であり、

(7)前記HCDR1～3は、配列番号58～60であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号61～63であり、

(8)前記HCDR1～3は、配列番号64～66であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号67～69であり、

(9)前記HCDR1～3は、配列番号74～76であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号77～79であり、

(10)前記HCDR1～3は、配列番号86～88であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号89～91であり、

(11)前記HCDR1～3は、配列番号92～94であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号95～97であり、

(12)前記HCDR1～3は、配列番号98～100であり、又は／及び前記LCDR1～3は、配列番号101～103であり、或いは

(13)前記HCDR1～3又は／及び前記LCDR1～3は、群(1)～(12)の何れか1群に記載のHCDR1～3又は／及びLCDR1～3中の各CDRと比べて、同一

10

20

30

40

50

性が少なくとも 80% であるか、又は多くとも 3 つの挿入、欠失若しくは置換突然変異が生じるアミノ酸配列を有する、

から選ばれる、

請求項 19 に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 21】

前記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域 (VH) 又は／及び軽鎖可変領域 (VL) を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号 1、3、19、21、37、46、54、56、71、80、82 若しくは 84 に示されるアミノ酸配列を含み、又は／及び前記軽鎖可変領域は、配列番号 2、4、20、22、38、47、55、57、72、81、83 若しくは 85 に示されるアミノ酸配列を含み、或いは前記重鎖可変領域又は／及び前記軽鎖可変領域はそれぞれ、前記何れか 1 つの重鎖可変領域又は／及び軽鎖可変領域と比べて、少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項 17 又は 18 に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 22】

前記抗体又は抗原結合断片は、重鎖定常領域配列及び／又は軽鎖定常領域配列を含み、選択可能的に、前記重鎖定常領域及び／又は軽鎖定常領域は、完全な定常領域配列又はその断片から選られ、前記定常領域断片は、CH1、ヒンジ領域、CH2、CH3 又は Fc を含み、選択可能的に、前記重鎖定常領域は、ヒト又はマウス IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 定常領域から選られ、前記軽鎖定常領域は、ヒト又はマウス kappa 定常領域若しくは lambda 定常領域から選られ、選択可能的に、前記抗体又は抗原結合断片は、完全な重鎖と軽鎖を含み、前記重鎖は、前記 VH と重鎖定常領域からなり、前記重鎖定常領域は、配列番号 5、39 又は 73 に示されるアミノ酸配列を有し、前記軽鎖は、前記 VL と軽鎖定常領域からなり、前記軽鎖定常領域は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を有する、

請求項 17 ～ 21 の何れか一項に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 23】

前記抗体は、Trastuzumab、Pertuzumab 又は Rituximab から選ばれる、

請求項 17 ～ 22 の何れか一項に記載のリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩。

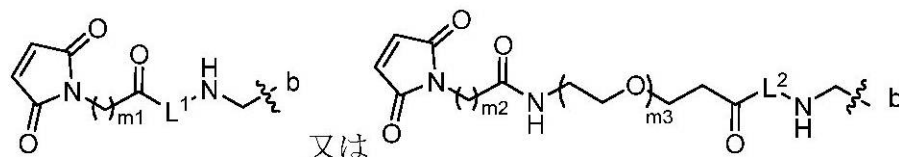
【請求項 24】

一般構造式が L' - D である薬物ーリンカー化合物又はその薬学的に許容される塩であって、そのうち、

薬物ユニット D は、請求項 1 ～ 10 の何れか一項で定義される通りであり、

リンカーユニット L' は、

【化 12】



から選られ、その b 末端は薬物ユニット D に共有結合しており、L¹、L²、m₁、m₂、m₃ は、請求項 11 ～ 15 の何れか一項で定義される通りである、

薬物ーリンカー化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 25】

L' は、

10

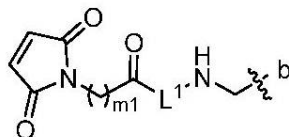
20

30

40

50

【化 1 3】



から選られ、その b 末端は薬物ユニット D に共有結合しており、m 1 は 5 から選られ、且つ L¹ は、G l y - G l y - P h e - G l y テトラペプチド残基又は A l a - A l a - A l a トリペプチド残基から選られる、

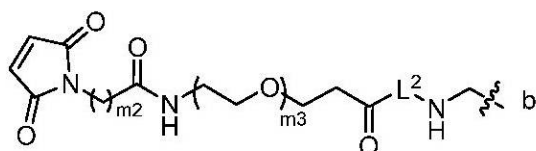
請求項 2 4 に記載の薬物-リンカー化合物又はその薬学的に許容される塩。

10

【請求項 2 6】

L' は、

【化 1 4】



から選られ、その b 末端は薬物ユニット D に共有結合しており、m 2 は 2 から選られ、m 3 は 8 から選られ、且つ L² は、G l y - G l y - P h e - G l y テトラペプチド残基又は V a l - L y s ジペプチド残基から選られる、

請求項 2 4 に記載の薬物-リンカー化合物又はその薬学的に許容される塩。

20

【請求項 2 7】

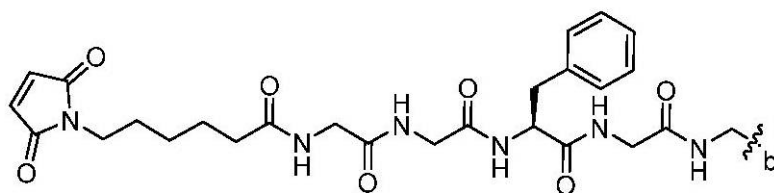
L' は、下記化学構造：

30

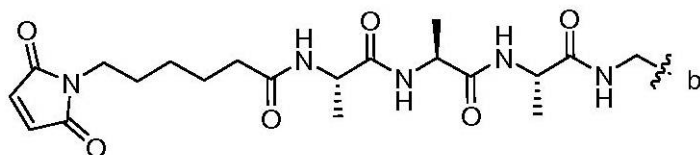
40

50

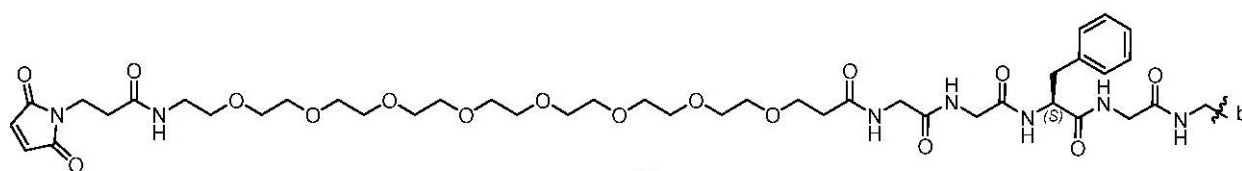
【化 1 5】



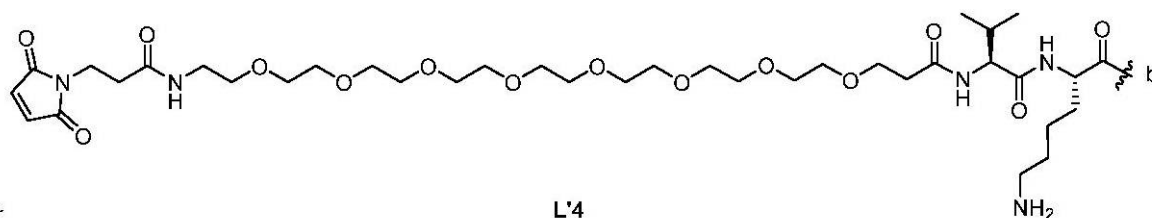
L'1



L'2



L'3



L'4

又は

から選ばれ、そのb末端は薬物ユニットDに共有結合している、
請求項24～26の何れか一項に記載の薬物－リンカー化合物又はその薬学的に許容され
る塩。

【請求項28】

下記化合物又はその薬学的に許容される塩：

10

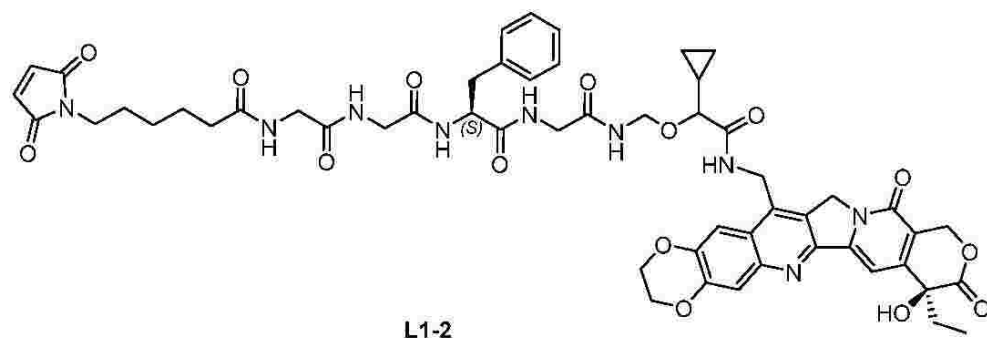
20

30

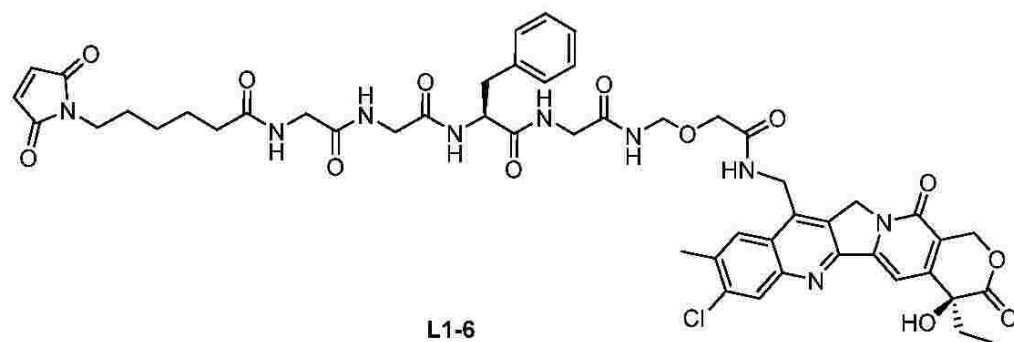
40

50

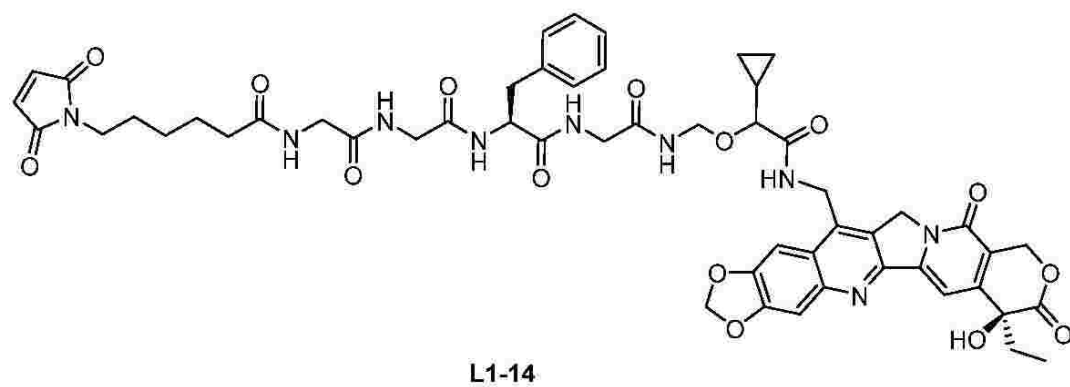
【化 1 6】



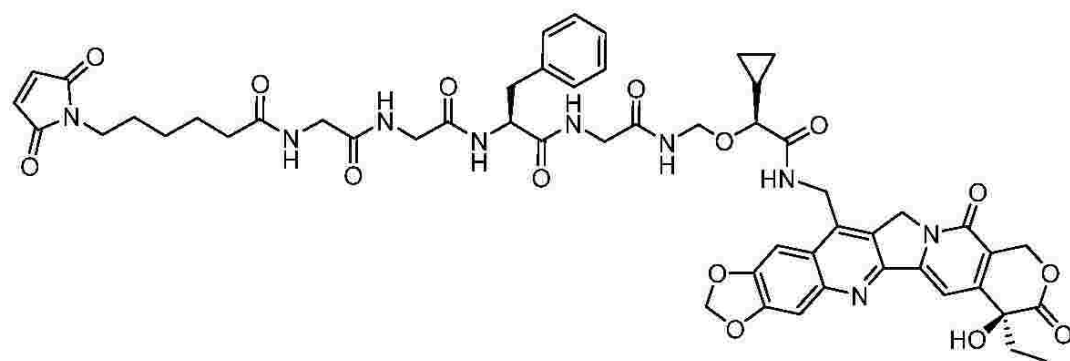
10



20

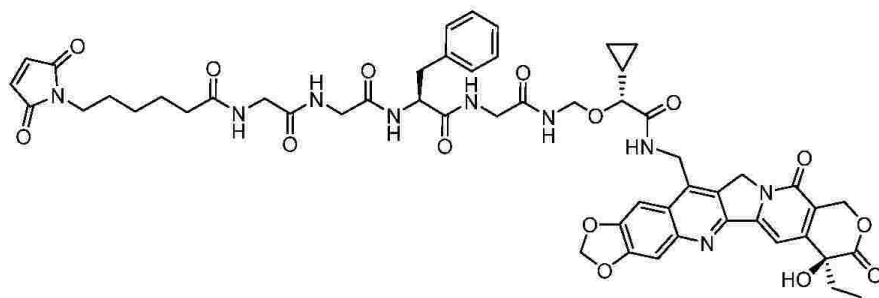


30

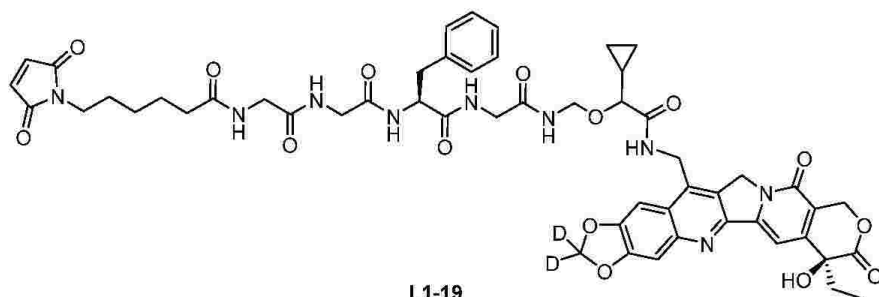


40

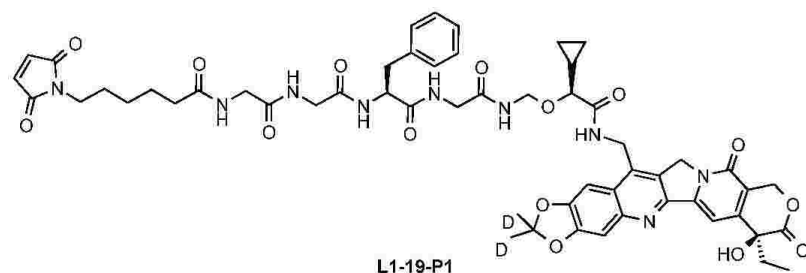
50



10

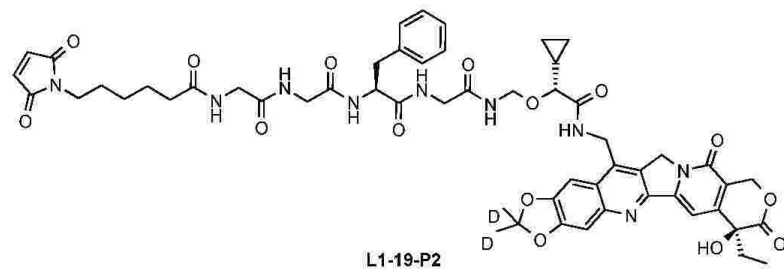


L1-19



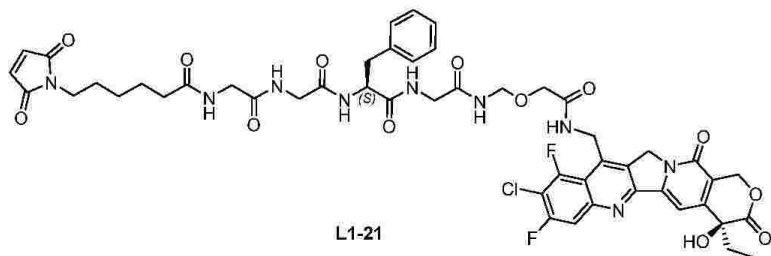
L1-19-P1

20



L1-19-P2

30



L1-21

40

50



L1-24



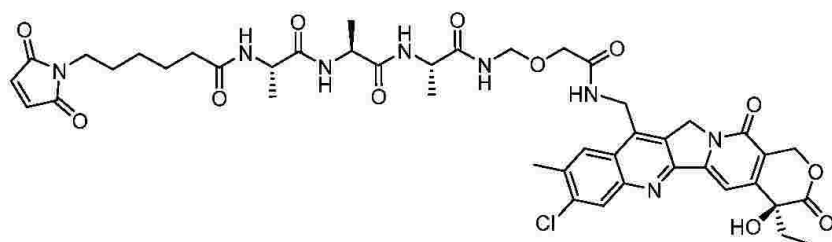
L1-30



L1-31

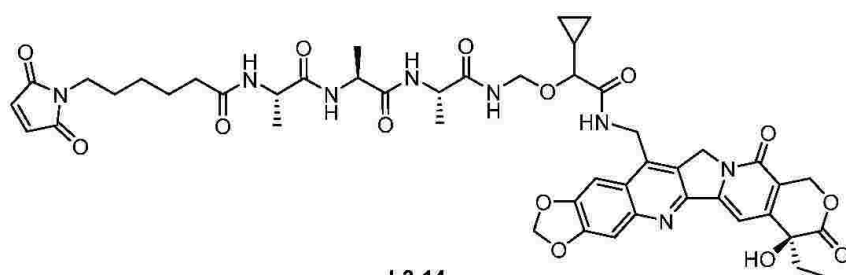


L1-35



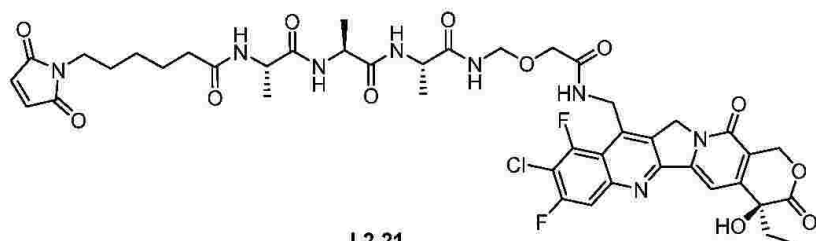
L2-6

10



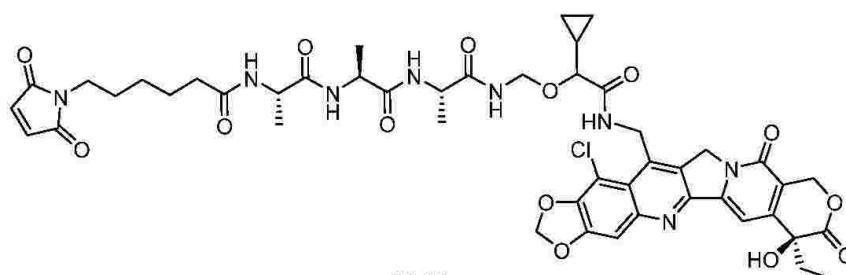
L2-14

20



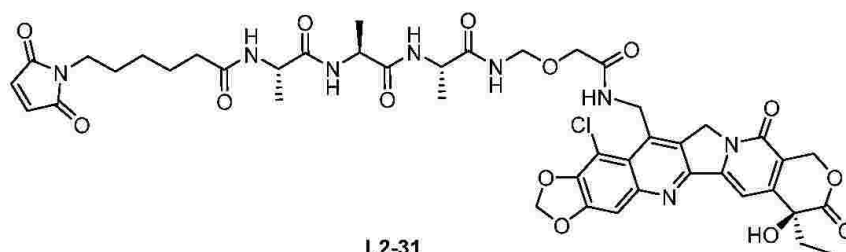
L2-21

30



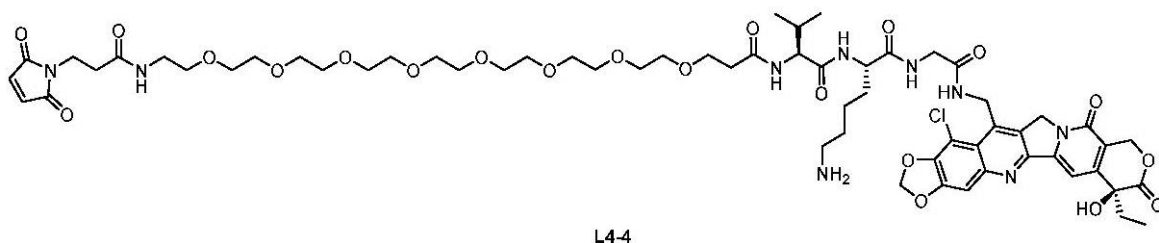
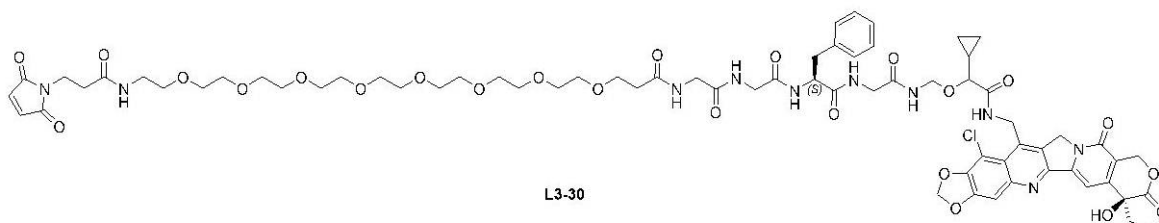
L2-30

40



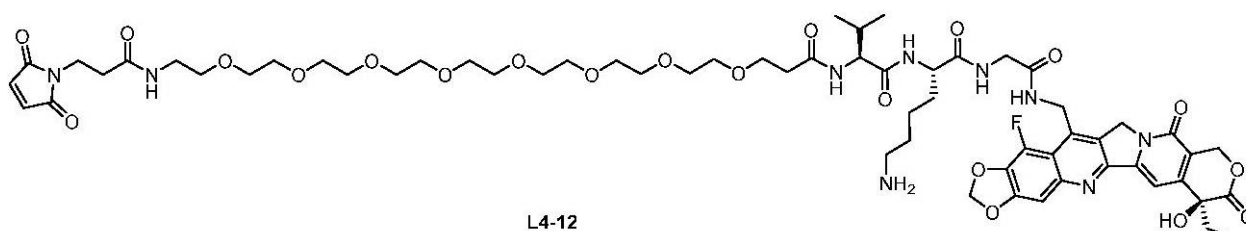
L2-31

50



又は

10



20

から選ばれる、

請求項 24～27 の何れか一項に記載の薬物－リンカー化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 29】

請求項 1～23 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、及び薬学的に許容される添加物を含む、医薬組成物。

30

【請求項 30】

腫瘍を治療する薬物の製造における、請求項 1～23 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いは請求項 29 に記載の医薬組成物の用途。

【請求項 31】

請求項 24～28 の何れか一項に記載の薬物－リンカー化合物をリガンドとカップリングするステップを含み、選択可能に、前記リガンドは抗体又はその抗原結合断片である、請求項 1～23 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩の製造方法。

【請求項 32】

必要とする対象の腫瘍を治療する方法であって、請求項 1～23 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いは請求項 29 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

40

【請求項 33】

対象の腫瘍を治療するための、請求項 1～23 の何れか一項に記載のリガンド－薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いは請求項 29 に記載の医薬組成物の用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2022年5月12日に提出された出願番号が202210515898.0で

50

ある中国特許出願、2022年8月19日に提出された出願番号が202210999585.7である中国特許出願、及び2023年4月14日に提出された出願番号が202310406469.4である中国特許出願の優先権の利益を主張し、これらの特許出願書類は、全ての目的のために引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、生物医学分野に属し、構造新規のリガンドー薬物複合体、その製造方法、当該複合体を含む医薬組成物、及び抗腫瘍薬としての用途に関する。

【背景技術】

【0003】

抗体ー薬物複合体 (antibody-drug conjugate、ADC) は、新規な標的薬物として、腫瘍細胞表面抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体と生物学的活性を有する毒素分子とを連結することにより、抗体の腫瘍標的性と毒素分子の高効率な殺傷作用とを組み合わせると同時に、前者の治療効果が比較的低いこと及び後者の毒性と副作用が大きすぎる、創薬可能性が悪いことなどの欠陥を回避する。従来の化学療法薬と比べ、ADC薬物は、腫瘍細胞を正確に標的とすると共に、正常細胞に対する影響を低減して、より安全で効果的な抗腫瘍効果を達成することができる。

【0004】

2000年に最初の抗体薬物複合体 Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) は米国FDAから販売承認を取得し、成人急性骨髄性白血病 (AML) の治療に用いられる。2011年に米国FDAは、ホジキンリンパ腫及び全身性未分化大細胞リンパ腫の治療のための新規なADCを標的とする薬物である Adcetris (brexunimab vedotin) の販売を承認した。Mylotarg 及び Adcetris は両方とも、血液腫瘍に対する治療薬である。2013年に、Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine、T-DM1) は米国FDAにより承認され、HER2陽性と同時にトラスツズマブ (Trastuzumab) 及びパクリタキセルに対して耐性を有する進行性又は転移性乳癌の治療に用いられ、最初に承認された固形腫瘍を治療するADC薬物である。

【0005】

ADCは、一般的に、抗体、リンカー及び毒素という3つの部分を含む。カンプトテシン系誘導体は、トポイソメラーゼIを阻害することにより抗腫瘍効果を達成する、ADC開発に適用される毒素のうちの一つである。第一三共会社 (Daiichi Sankyo) は、カンプトテシン系誘導体エキサテカン毒素として採用し、HER2標的に対して、ADC薬物 Enhertu (Trastuzumab deruxtecan、DS-8201) を開発し、それは2019年に米国FDAから販売承認を取得した。臨床研究により、Enhertu はHER2陽性の乳癌、胃癌及び非小細胞肺癌などの何れに対しても比較的良好な治療効果を有することが示される。

【0006】

現在、複数のADC薬物が市販されているにもかかわらず、幾つかの安全性の問題及び薬物耐性の問題が依然として存在し、満たされていない臨床的ニーズが依然として非常に大きい。従って、当技術分野では、より効果的で安全なADC薬物の更なる開発が急務とされている。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、一般構造式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩を提供し、

そのうち、

Pcは、リガンドユニットであり、

Lは、リンカーユニットであり、

Dは、下記式 (D-I) で示される薬物ユニットであり、

10

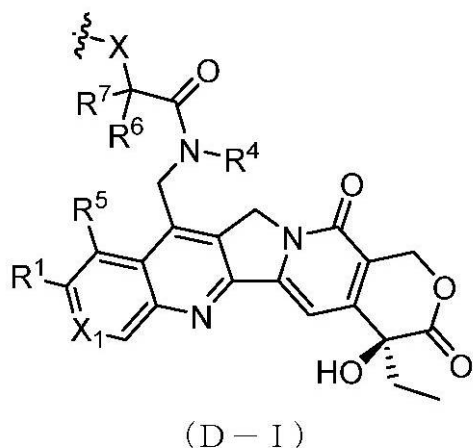
20

30

40

50

【化 1】



10

そのうち、

Xは、NH又はOから選ばれ、

R¹は、ハロゲン、CN、C₁－C₆アルキル基、C₃－C₆シクロアルキル基又はC₂－C₆アルキニル基から選ばれ、上記C₁－C₆アルキル基、C₃－C₆シクロアルキル基又はC₂－C₆アルキニル基は、任意選択的に1つ又は複数のR^{a1}で置換され、

20

X₁は、CR²又はNから選ばれ、

R²は、H、ハロゲン、CNから選ばれ、又はR¹、R²は、それらに連結している原子と共に5～6員ヘテロシクリル基を形成し、上記5～6員ヘテロシクリル基は、任意選択的に1つ又は複数のR^{a2}で置換され、

R⁴は、H、C₁－C₃アルキル基、C₃－C₆シクロアルキル基又は4～7員ヘテロシクリル基から選ばれ、上記C₁－C₃アルキル基、C₃－C₆シクロアルキル基又は4～7員ヘテロシクリル基は、任意選択的に1つ又は複数のR^{a4}で置換され、

R⁵は、H、ハロゲン、CN、NH₂又はNO₂から選ばれ、或いはR¹、R⁵は、それらに連結している原子と共に5～6員ヘテロシクリル基、5～6員ヘテロアリール基又はC₅－C₇シクロアルケニル基を形成し、上記5～6員ヘテロシクリル基、5～6員ヘテロアリール基又はC₅－C₇シクロアルケニル基は、任意選択的に1つ又は複数のR^{a5}で置換され、

30

R⁶は、H又はC₁－C₃アルキル基から選ばれ、

R⁷は、H、C₁－C₃アルキル基又はC₃－C₆シクロアルキル基から選ばれ、或いはR⁶、R⁷は、それらに連結しているC原子と共にC₃－C₆シクロアルキル基を形成し、上記C₃－C₆シクロアルキル基は、任意選択的に1つ又は複数のR^{a7}で置換され、

各R^{a1}、R^{a2}、R^{a4}、R^{a5}、R^{a7}は、独立的にD、ハロゲン、CN、=O、OH、NH₂、C₁－C₃アルキル基、C₃－C₆シクロアルキル基又は4～7員ヘテロシクリル基から選ばれ、上記OH、NH₂、C₁－C₃アルキル基、C₃－C₆シクロアルキル基又は4～7員ヘテロシクリル基は、任意選択的に1つ又は複数のR^bで置換され、

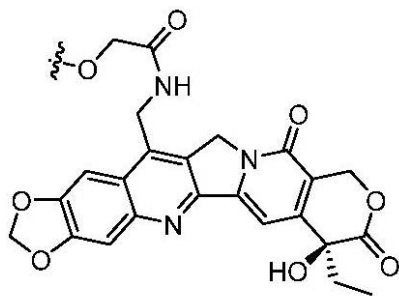
40

各R^bは、独立的にハロゲン、CN、=O、C₁－C₃アルキル基、OH、O(C₁－C₃アルキル基)、NH₂、NH(C₁－C₃アルキル基)又はN(C₁－C₃アルキル基)₂から選ばれ、

条件として、i) R¹がメチル基から選ばれ、R²がFから選ばれる場合、R⁶、R⁷は、それらに連結しているC原子と共にシクロプロピル基を形成し、ii) XがNHから選ばれる場合、R⁵はHから選ばれず、iii) 式(D-I)で示される化合物は、

50

【化 2】



10

を含まず、

且つ、 n は 1 ～ 16 の実数である。

【0008】

幾つかの実施形態において、各 R^{a1} 、 R^{a2} 、 R^{a4} 、 R^{a5} 、 R^{a7} は、独立的に D、ハロゲン、CN、=O、OH、 NH_2 、 $C_1 - C_3$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は 4 ～ 7 員ヘテロシクリル基から選ばれる。

【0009】

幾つかの実施形態において、各 R^{a2} と R^{a7} は、独立的に D から選ばれる。

【0010】

幾つかの実施形態において、 R^1 は、ハロゲン、 $C_1 - C_3$ アルキル基、 $C_3 - C_6$ シクロアルキル基又は $C_2 - C_3$ アルキニル基から選ばれる。

20

【0011】

幾つかの実施形態において、 R^1 は、Cl、Br、メチル基、シクロプロピル基又はエチニル基から選ばれる。

【0012】

幾つかの実施形態において、 R^1 は、Cl、Br 又はメチル基から選ばれる。

【0013】

幾つかの実施形態において、 R^2 は、H、ハロゲン、CN から選ばれ、又は R^1 、 R^2 は、それらに連結している原子と共に 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基を形成し、上記 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基は、環原子として 1 又は 2 個の酸素原子を含み、上記 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の D 原子で置換される。

30

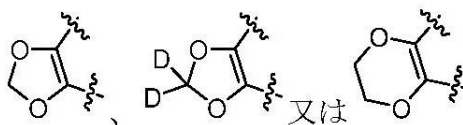
【0014】

幾つかの実施形態において、 R^2 は、H、ハロゲン、CN から選ばれ、又は R^1 、 R^2 は、それらに連結している原子と共に 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基を形成し、上記 5 ～ 6 員ヘテロシクリル基は、環原子として 1 又は 2 個の酸素原子を含む。

【0015】

幾つかの実施形態において、 R^2 は、H、F 又は Cl から選ばれ、或いは R^1 、 R^2 は、それらに連結している原子と共に

【化 3】



40

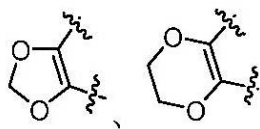
を形成する。

【0016】

幾つかの実施形態において、 R^2 は、H、F 又は Cl から選ばれ、或いは R^1 、 R^2 は、それらに連結している原子と共に

50

【化 4】



を形成する。

【0017】

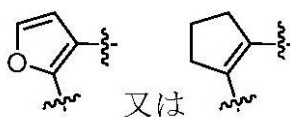
幾つかの実施形態において、 R^5 は、H、ハロゲン、 NH_2 又は NO_2 から選ばれ、或いは R^1 、 R^5 は、それらに連結している原子と共に 5～6 員ヘテロアリール基又は $C_5 - C_6$ シクロアルケニル基を形成し、上記 5～6 員ヘテロアリール基又は $C_5 - C_6$ シクロアルケニル基は、任意選択的に 1 つ又は複数の R^{a5} で置換される。

10

【0018】

幾つかの実施形態において、 R^5 は、H、Cl、F、 NH_2 又は NO_2 から選ばれ、或いは R^1 、 R^5 は、それらに連結している原子と共に

【化 5】



20

を形成する。

【0019】

幾つかの実施形態において、 R^4 は、H 又は $C_1 - C_3$ アルキル基から選ばれる。

【0020】

幾つかの実施形態において、 R^4 は、H から選ばれる。

【0021】

幾つかの実施形態において、 R^6 は、H 又はメチル基から選ばれる。

【0022】

幾つかの実施形態において、 R^7 は、H、 $C_1 - C_3$ アルキル基又は任意選択的に 1 つ又は複数の D で置換された $C_3 - C_6$ シクロアルキル基から選ばれ、或いは R^6 、 R^7 は、それらに連結している C 原子と共に $C_3 - C_6$ シクロアルキル基を形成する。

30

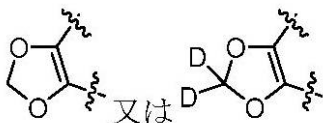
【0023】

幾つかの実施形態において、 R^7 は、H、メチル基、イソプロピル基又は任意選択的に 1 つ又は複数の D で置換されたシクロプロピル基から選ばれ、或いは R^6 、 R^7 は、それらに連結している C 原子と共にシクロプロピル基を形成する。

【0024】

幾つかの実施形態において、 R^1 、 R^2 は、それらのそれぞれに連結している C 原子と共に

【化 6】



40

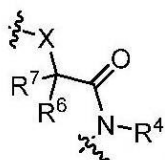
を形成し、 R^6 は、H 又はメチル基から選ばれ、 R^7 は、H、メチル基、イソプロピル基又は任意選択的に 1 つ又は複数の D で置換されたシクロプロピル基から選ばれ、或いは R^6 、 R^7 は、それらに連結している C 原子と共にシクロプロピル基を形成する。

【0025】

幾つかの実施形態において、構造ユニット

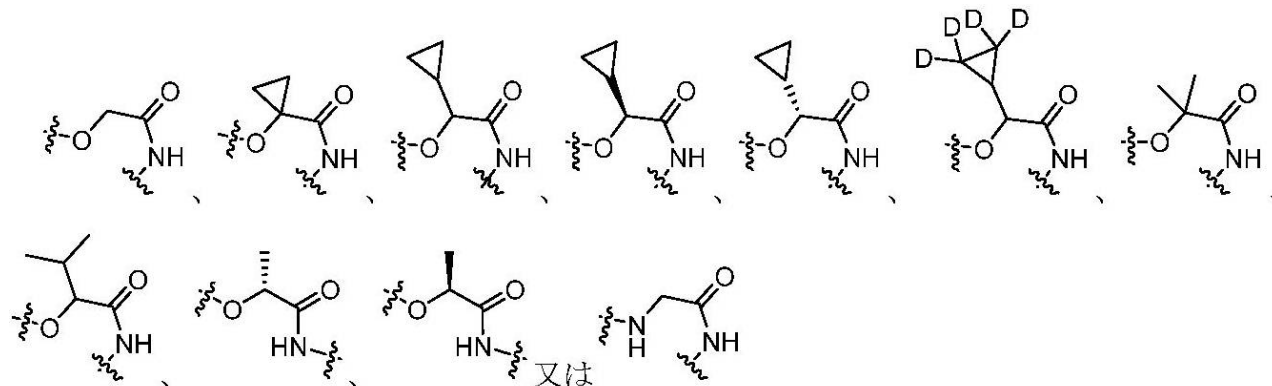
50

【化 7】



は、

【化 8】



10

20

から選ばれる。

【0026】

幾つかの実施形態において、 R^1 は、メチル基から選ばれ、 R^2 は、F から選ばれ、 R^6 、 R^7 は、それらに連結している C 原子と共にシクロプロピル基を形成する。

【0027】

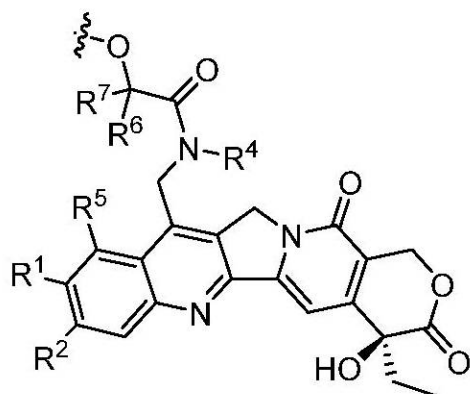
幾つかの実施形態において、X は、NH から選ばれ、 R^5 は、Cl、F、 NH_2 又は NO_2 から選ばれる。

【0028】

幾つかの実施形態において、式 (D-I) で示される薬物ユニットは、式 (D-Ia) で示される薬物ユニットから選ばれ、

30

【化 9】



(D-I a)

40

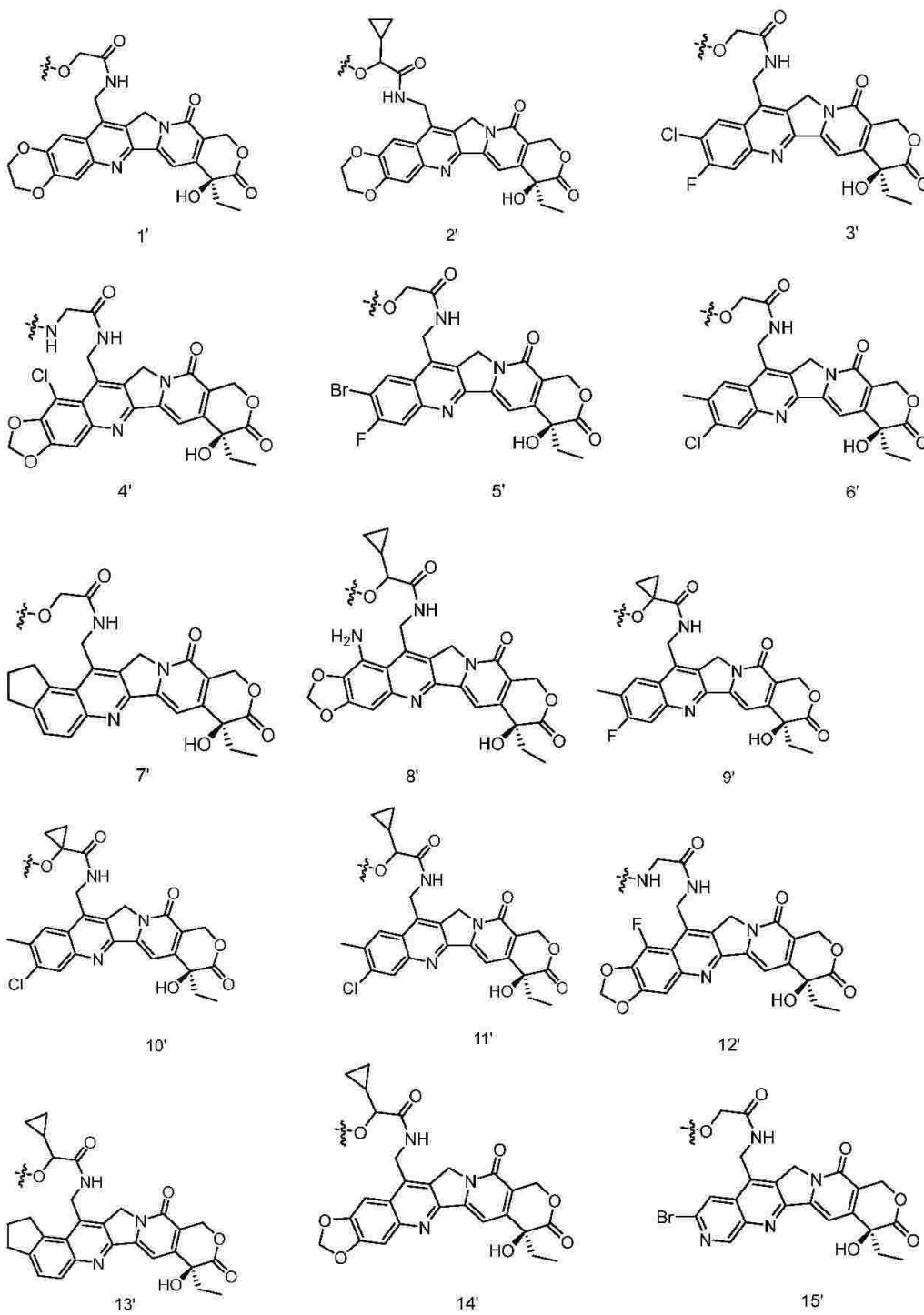
そのうち、 R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 は、上記で定義される通りである。

【0029】

幾つかの実施形態において、式 (D-I) で示される化合物は、以下に示される化合物：

50

【化 10】



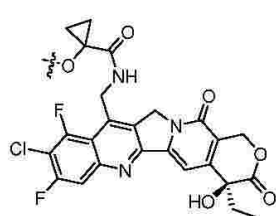
10

20

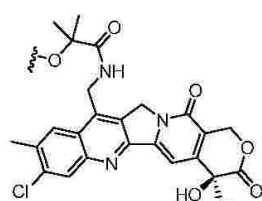
30

40

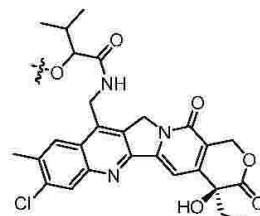
50



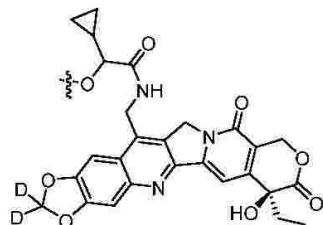
16'



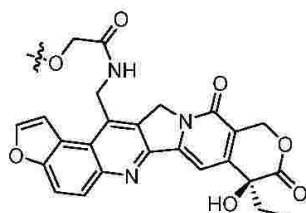
17'



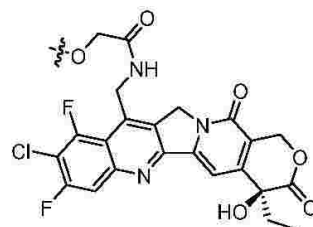
18'



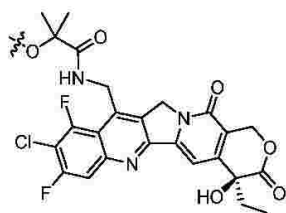
19'



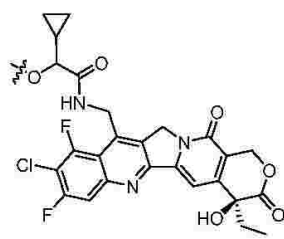
20'



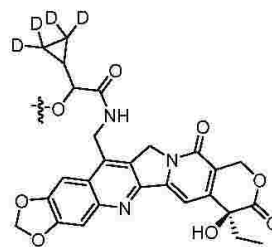
21'



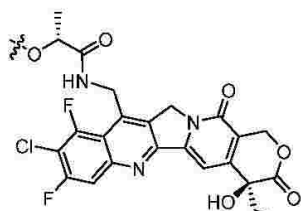
22'



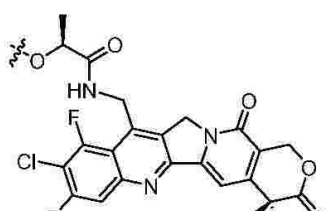
23'



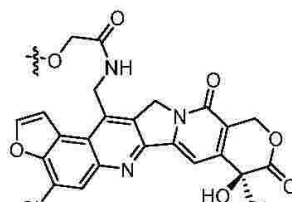
24'



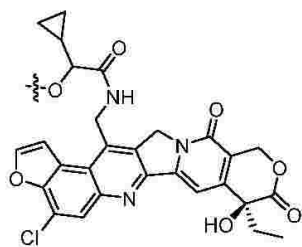
25'



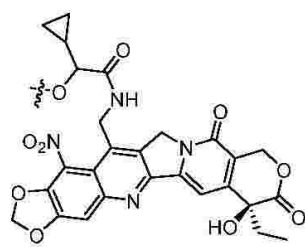
26'



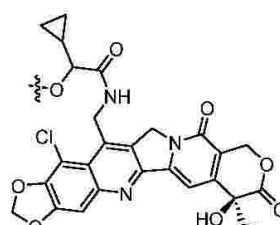
27'



28'



29'



30'

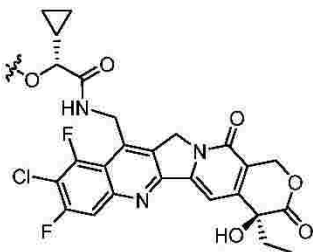
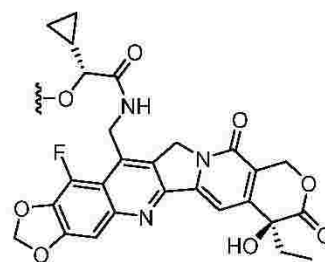
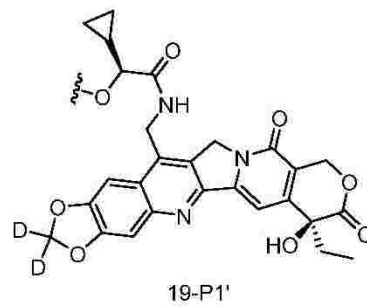
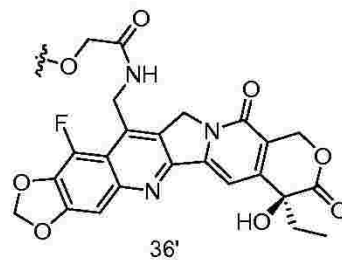
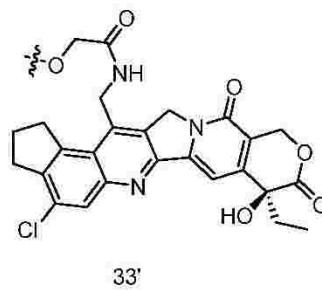
10

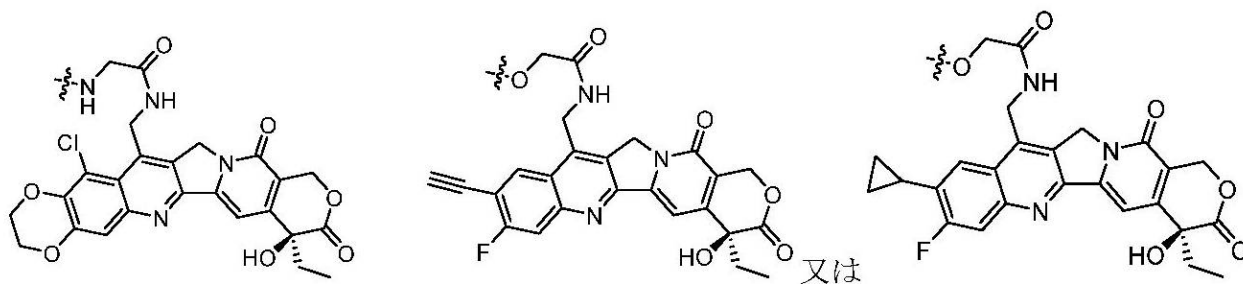
20

30

40

50





10

から選ばれる。

【 0 0 3 0 】

幾つかの実施形態において、本開示は、一般構造式が $Pc - (L - D)_n$ であるリガンド-薬物複合体又はその薬学的に許容される塩を提供し、そのうち、

Pc 、 L 、 n は、上記で定義される通りであり、

D は、下記化合物：

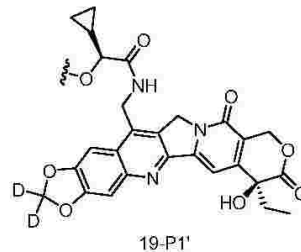
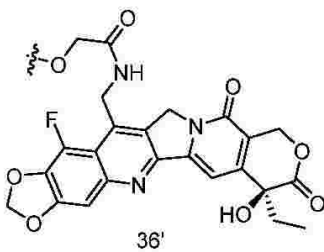
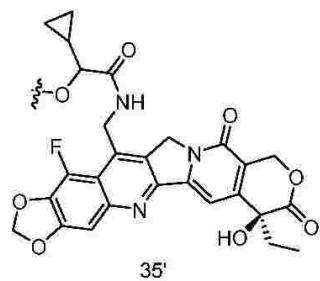
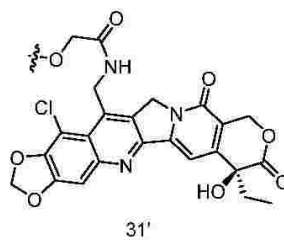
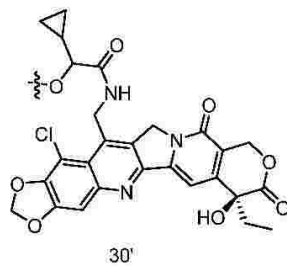
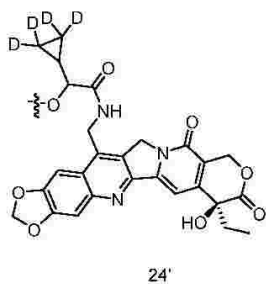
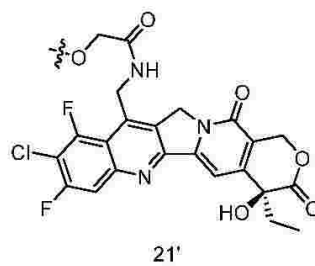
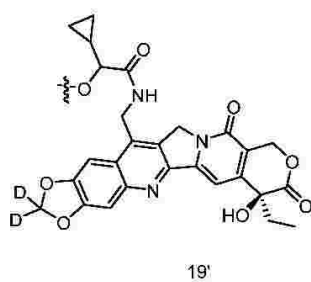
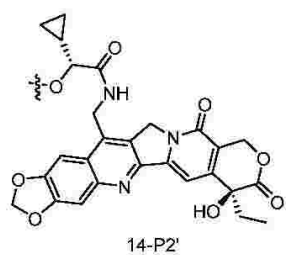
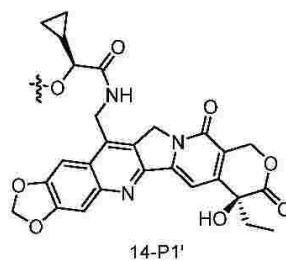
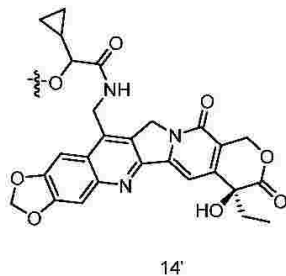
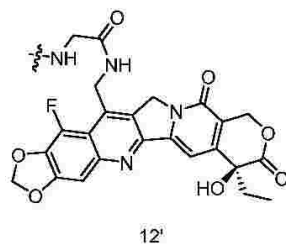
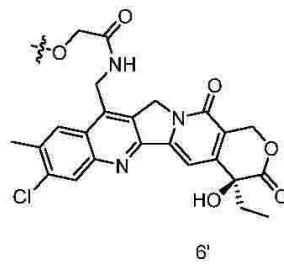
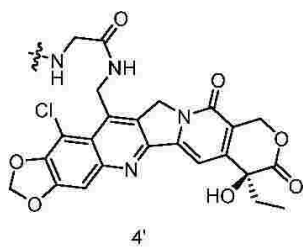
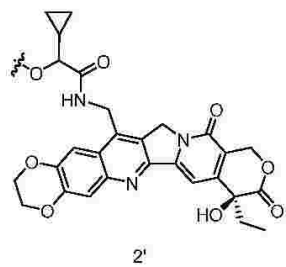
20

30

40

50

【化 1 1】



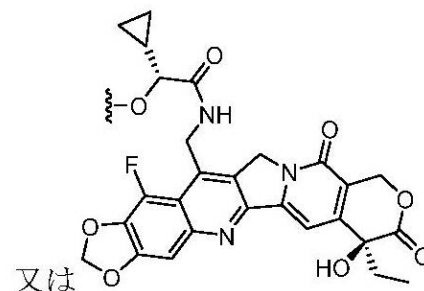
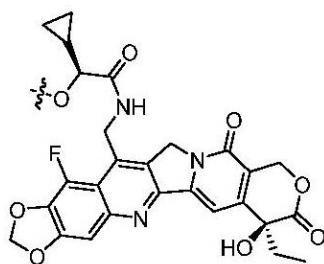
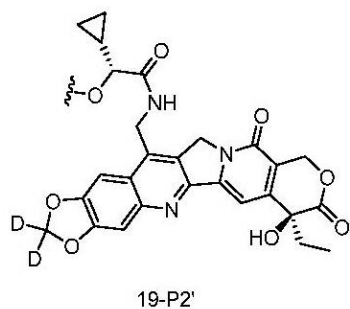
10

20

30

40

50



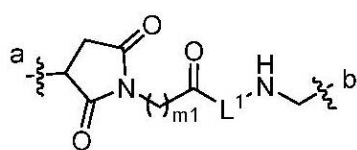
10

のうちの1つから選ばれる。

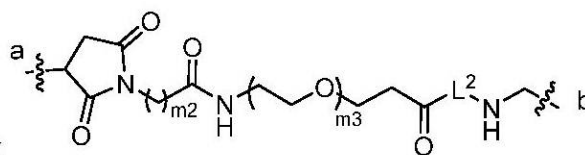
【0031】

幾つかの実施形態において、リンカーユニットLは、

【化12】



又は



20

から選られ、そのa末端はリガンドユニットPcに共有結合しており、b末端は薬物ユニットDに共有結合しており、そのうち、m1、m2は、それぞれ独立的に2～8の整数から選られ、m3は、1～16の整数から選られ、L¹、L²は、それぞれ独立的に1～8個のアミノ酸からなるペプチド残基から選られ、上記ペプチド残基は、更に任意選択的にハロゲン、CN、=O、C₁～C₆アルキル基、OH、O(C₁～C₆アルキル基)、NH₂、NH(C₁～C₆アルキル基)、N(C₁～C₆アルキル基)₂、C₃～C₆シクロアルキル基及び4～7員ヘテロシクリル基のうちの1つ又は複数の置換基で置換される。

【0032】

幾つかの実施形態において、上記L¹、L²は、それぞれ独立的に2、3又は4個のアミノ酸からなるペプチド残基から選られ、上記ペプチド残基は、更に任意選択的にハロゲン、CN、=O、C₁～C₆アルキル基、OH、O(C₁～C₆アルキル基)、NH₂、NH(C₁～C₆アルキル基)、N(C₁～C₆アルキル基)₂、C₃～C₆シクロアルキル基及び4～7員ヘテロシクリル基のうちの1つ又は複数の置換基で置換される。

【0033】

幾つかの実施形態において、上記L¹は、Gly-Gly-Phe-Glyテトラペプチド残基又はAla-Ala-Alaトリペプチド残基である。

【0034】

幾つかの実施形態において、上記L²は、Gly-Gly-Phe-Glyテトラペプチド残基又はVal-Lysジペプチド残基である。

【0035】

幾つかの実施形態において、m1は、5から選ばれる。

【0036】

幾つかの実施形態において、m2は、2から選られ、m3は、8から選ばれる。

【0037】

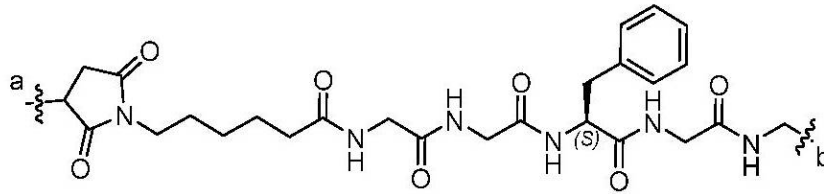
幾つかの実施形態において、リンカーユニットLは、下記の化学構造：

30

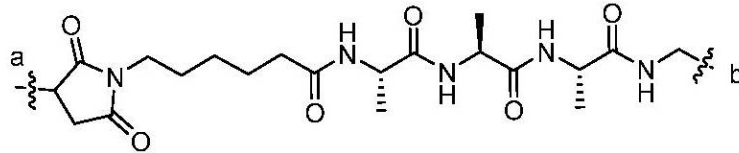
40

50

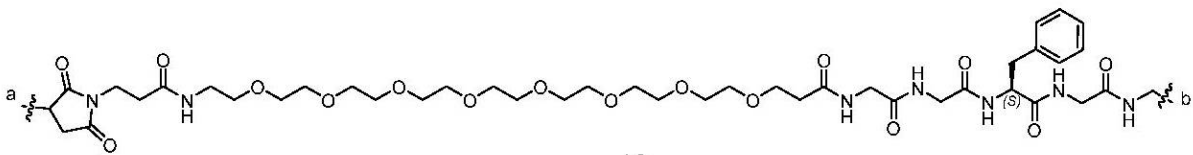
【化 1 3】



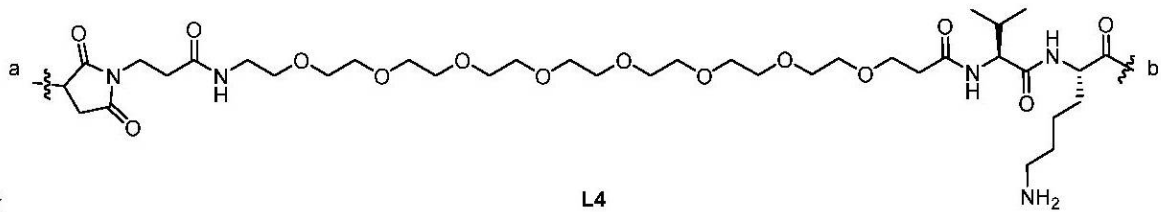
L1



L2



L3



L4

又は

から選ばれ、その a 末端はリガンドユニット P c に共有結合しており、b 末端は薬物ユニット D に共有結合している。

【0038】

幾つかの実施形態において、本開示の一般式が $Pc - (L - D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩は、下記の化合物又はその薬学的に許容される塩：

10

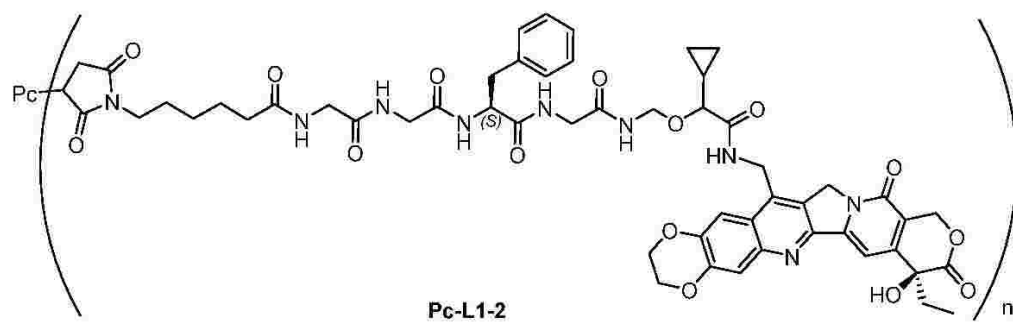
20

30

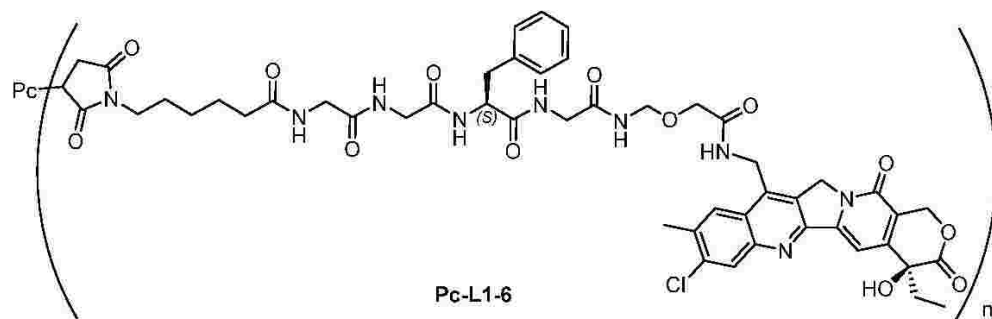
40

50

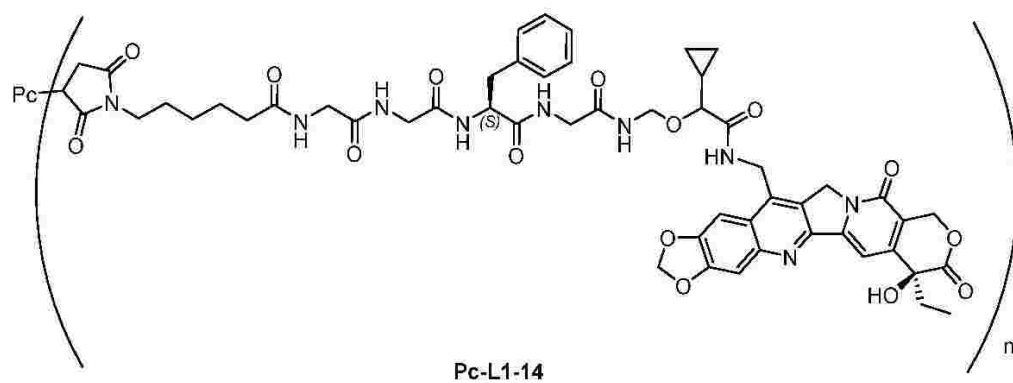
【化 1 4】



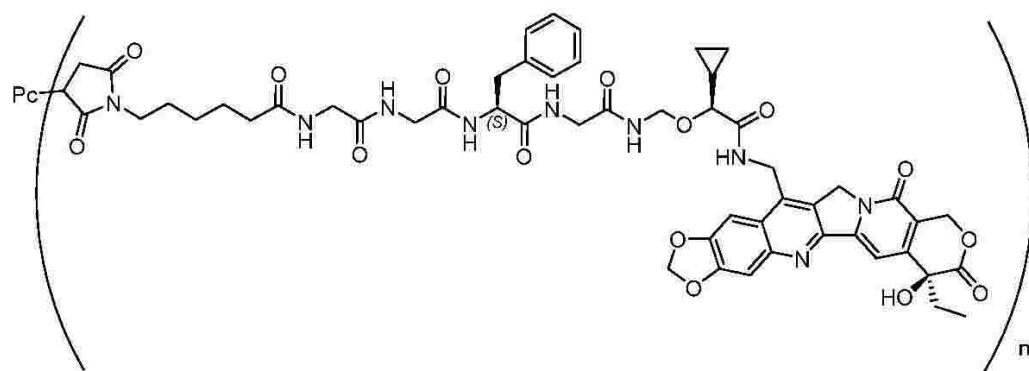
10



20

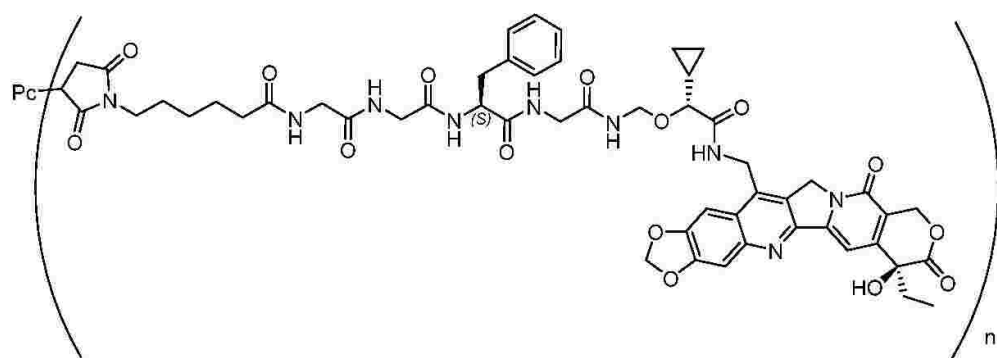


30

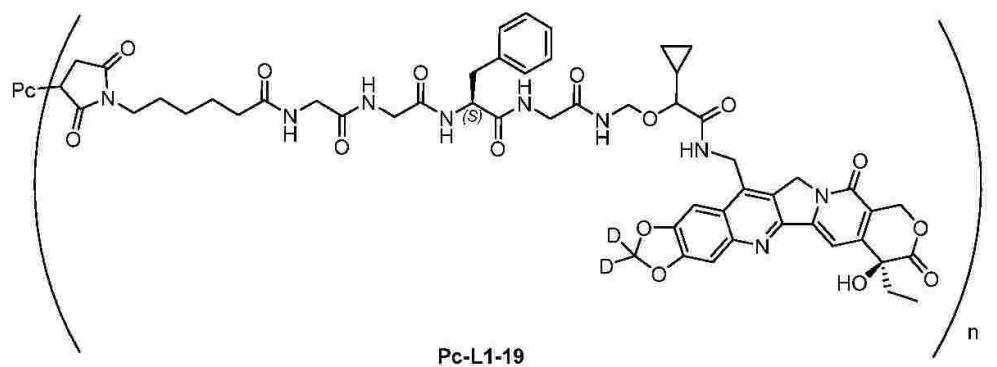


40

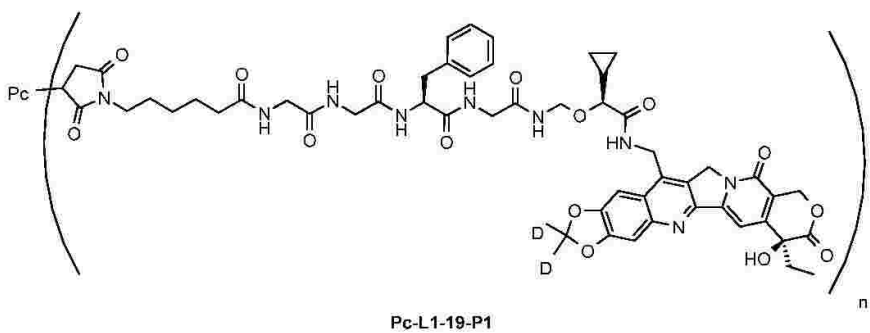
50



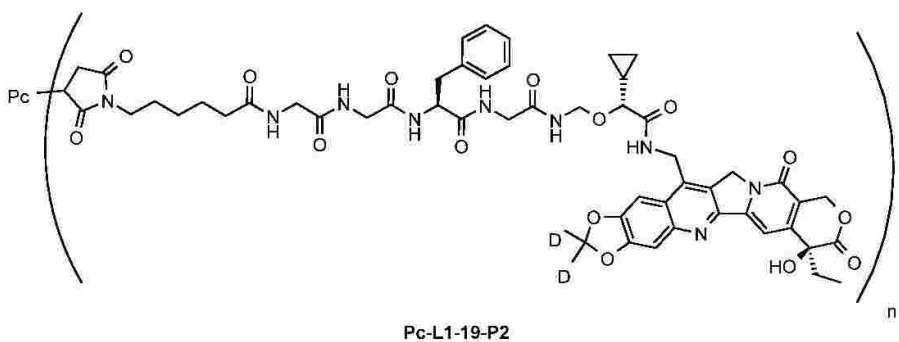
10



20

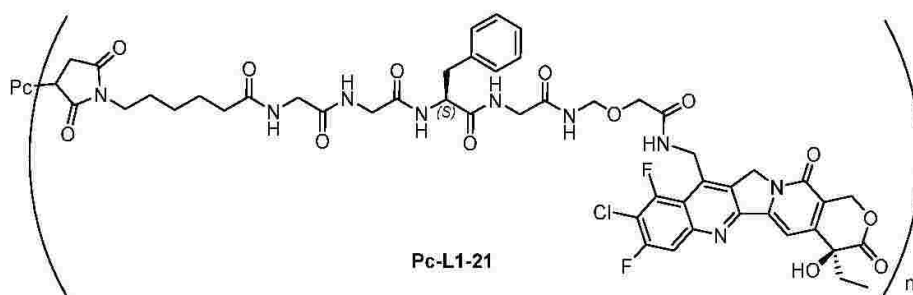


30

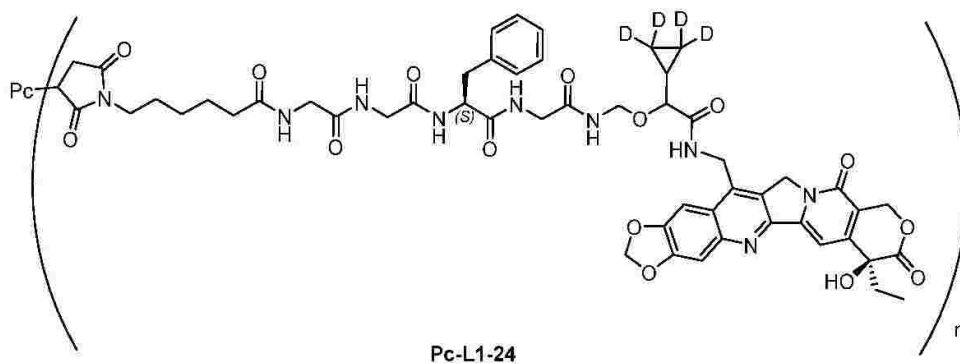


40

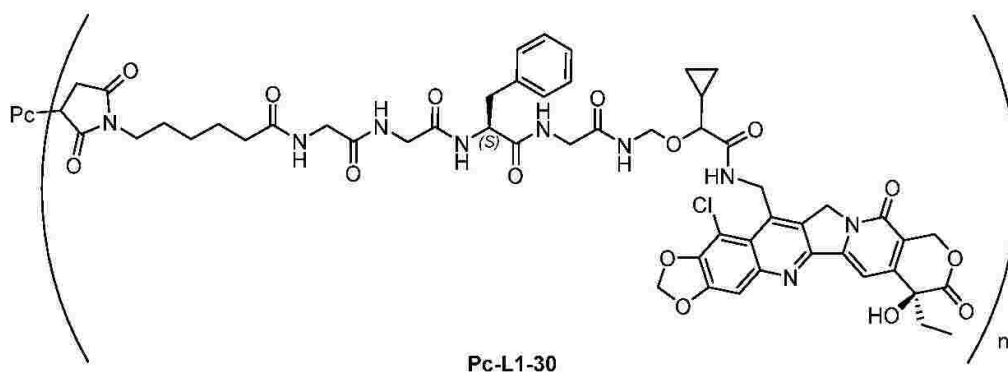
50



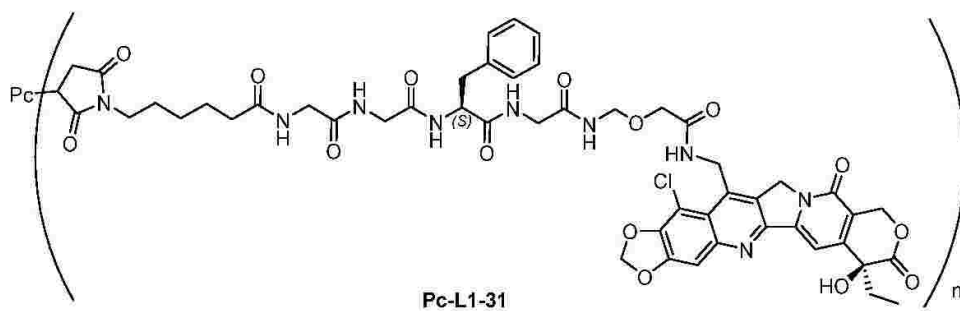
10



20

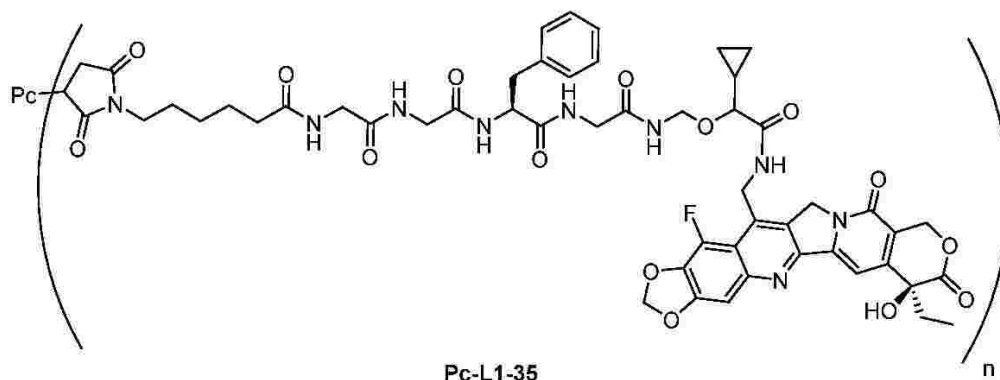


30

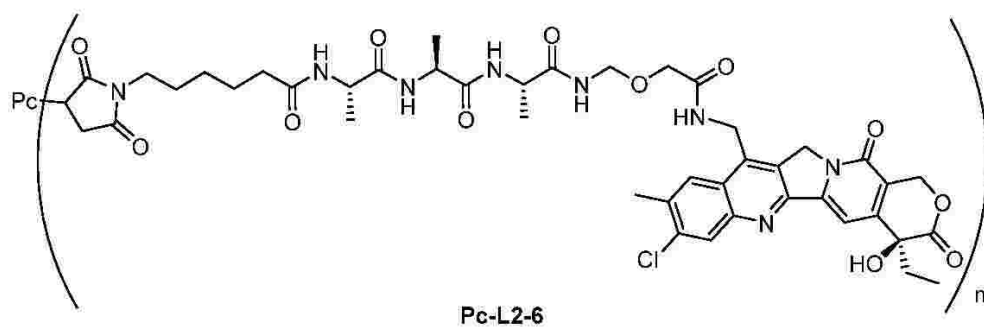


40

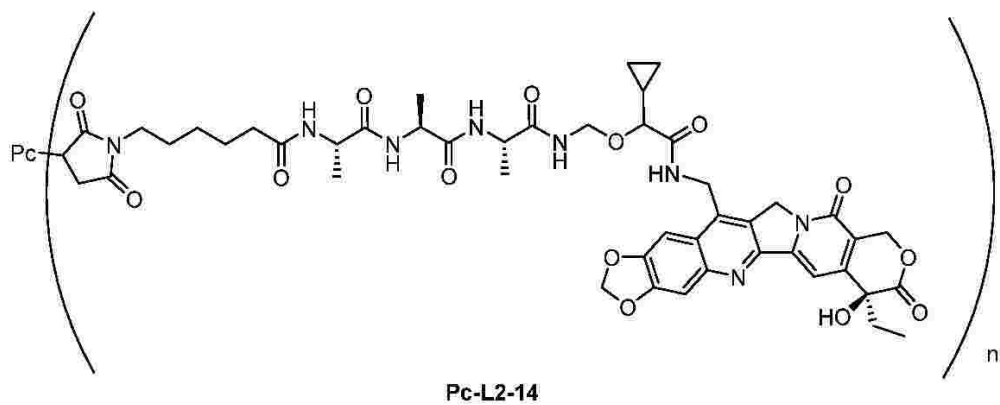
50



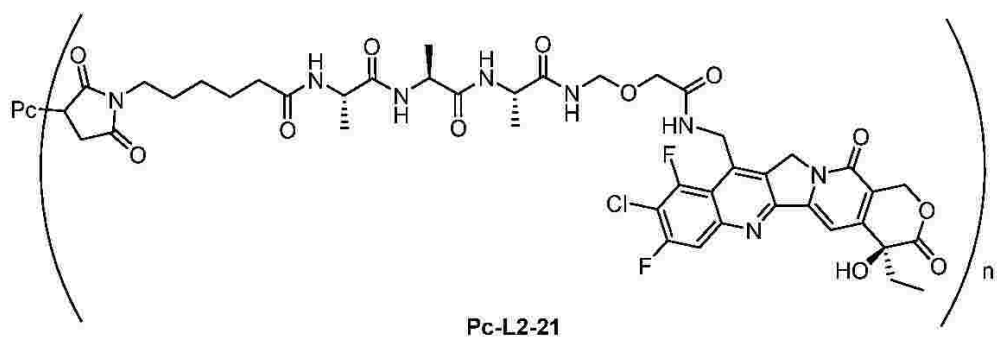
10



20

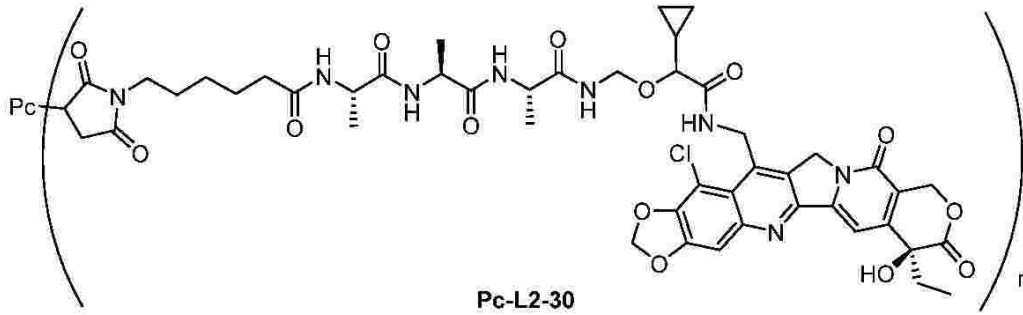


30

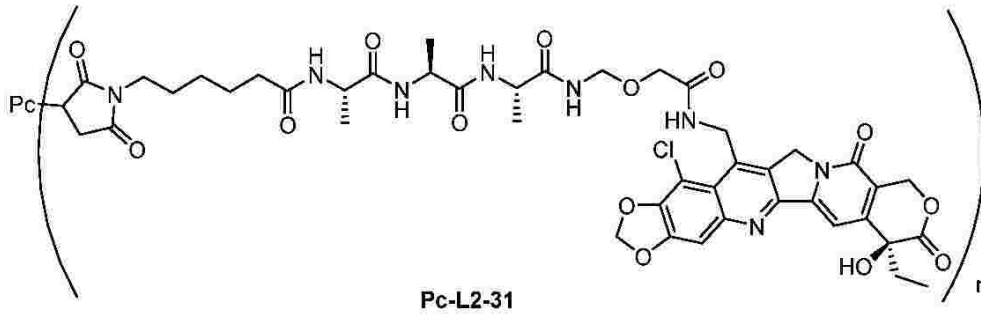


40

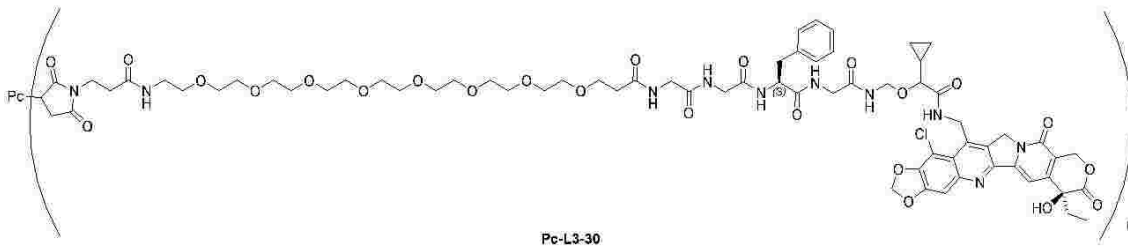
50



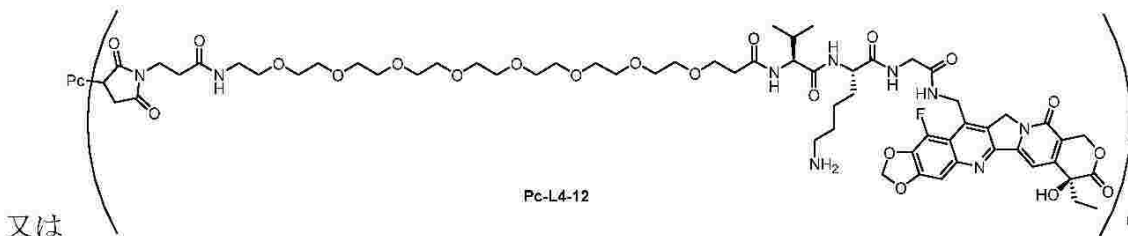
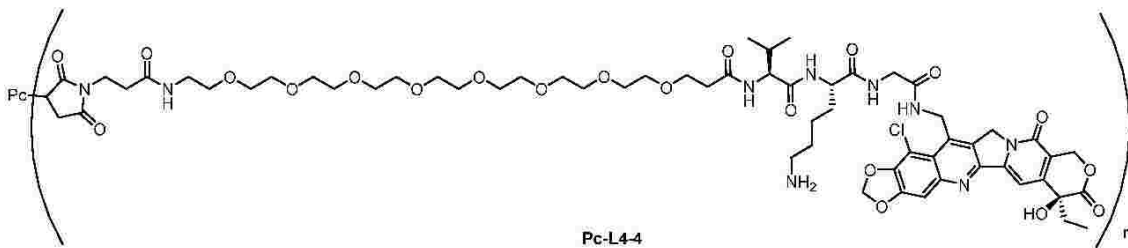
10



20



30



又は

40

から選ばれる。

【0039】

そのうち、Pcとnは、上記で定義される通りである。

【0040】

幾つかの実施形態において、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩であって、そのうち、上記リガンドユニットPcは、ポリペプチド、抗体又はその抗原結合断片から選ばれてもよい。

【0041】

幾つかの実施形態において、リガンドユニットPcは、HER2、p95HER2、HE

50

R 3、C D 3、C D 1 6、R O R 1、D L L 3、C D H 6、C D 7 0、C D 5、C D 2 0、B C M A、E G F R、V E G F 及び L I V - 1 からなる群より選ばれる 1 つ又は複数の抗原に特異的に結合することができる。

【 0 0 4 2 】

幾つかの実施形態において、上記抗体又はその抗原結合断片は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、又は四重特異性である。

【 0 0 4 3 】

幾つかの実施形態において、上記抗体は、T r a s t u z u m a b、P e r t u z u m a b 又は R i t u x i m a b から選ばれる。

【 0 0 4 4 】

幾つかの実施形態において、上記 P c は、H E R 2、p 9 5 H E R 2、C D H 6、R O R 1 若しくは L I V - 1 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であり、上記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域 (V H) 又は／及び軽鎖可変領域 (V L) を含み、幾つかの実施形態において、(1) 上記重鎖可変領域は、配列番号 1、3、19、21、37、46、54、56、71、80、82 若しくは 84 に示される V H に含まれる H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 を含み、又は／及び上記軽鎖可変領域は、配列番号 2、4、20、22、38、47、55、57、72、81、83 若しくは 85 に示される V L に含まれる L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 を含み、或いは (2) 上記重鎖可変領域又は／及び上記軽鎖可変領域は、群 (1) に記載の H C D R 1～3 又は／及び L C D R 1～3 中の各 C D R と比べて、少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列、又は多くとも 3 つの挿入、欠失若しくは置換突然変異が生じるアミノ酸配列を含み、更に、上記少なくとも 80% の同一性は、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の同一性である。選択可能的に、上記 H C D R 1～3 又は／及び上記 L C D R 1～3 は、K a b a t 番号付けシステム、C h o t h i a 番号付けシステム又は I M G T 番号付けシステムに従って決定される。

【 0 0 4 5 】

幾つかの実施形態において、上記重鎖可変領域は、H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 を含み、又は／及び上記軽鎖可変領域は、L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 を含み、そのうち、上記 H C D R 1～3 又は／及び上記 L C D R 1～3 は、

(1) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 7～9 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 10～12 であり、

(2) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 13～15 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 16～18 であり、

(3) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 23～25 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 26～28 であり、

(4) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 29～31 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 32～34 であり、

(5) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 40～42 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 43～45 であり、

(6) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 48～50 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 51～53 であり、

(7) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 58～60 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 61～63 であり、

(8) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 64～66 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 67～69 であり、

(9) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 74～76 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 77～79 であり、

(10) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 86～88 であり、又は／及び上記 L C D R 1～3 は、配列番号 89～91 であり、

(11) 上記 H C D R 1～3 は、配列番号 92～94 であり、又は／及び上記 L C D R 1

10

20

30

40

50

～３は、配列番号９５～９７であり、

(１２) 上記ＨＣＤＲ１～３は、配列番号９８～１００であり、又は／及び上記ＬＣＤＲ１～３は、配列番号１０１～１０３であり、或いは

(１３) 上記ＨＣＤＲ１～３又は／及び上記ＬＣＤＲ１～３は、群(１)～(１２)の何れか１群に記載のＨＣＤＲ１～３又は／及びＬＣＤＲ１～３中の各ＣＤＲと比べて、同一性が少なくとも８０％であるか、又は多くとも３つの挿入、欠失若しくは置換突然変異が生じるアミノ酸配列を有し、好ましくは、上記ＨＣＤＲ１～３又は／及び上記ＬＣＤＲ１～３は、群(１)～(１２)の何れか１群に記載のＨＣＤＲ１～３又は／及びＬＣＤＲ１～３中の各ＣＤＲと比べて、同一性が少なくとも８０％であるアミノ酸配列を有し、更に、上記少なくとも８０％の同一性は、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性である、から選ばれる。

10

【００４６】

幾つかの実施形態において、上記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域（ＶＨ）又は／及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、上記重鎖可変領域は、配列番号１、３、１９、２１、３７、４６、５４、５６、７１、８０、８２若しくは８４に示されるアミノ酸配列を含み、又は／及び上記軽鎖可変領域は、配列番号２、４、２０、２２、３８、４７、５５、５７、７２、８１、８３若しくは８５に示されるアミノ酸配列を含み、或いは、上記重鎖可変領域又は／及び上記軽鎖可変領域はそれぞれ、上記何れか１つの重鎖可変領域又は／及び軽鎖可変領域と比べて、少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、更に、上記少なくとも８０％の同一性は、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の同一性である。

20

【００４７】

幾つかの実施形態において、上記抗体又はその抗原結合断片は、重鎖定常領域配列及び／又は軽鎖定常領域配列を含み、上記重鎖定常領域及び／又は軽鎖定常領域は、完全な定常領域配列又はその断片から選られ、上記定常領域断片は、ＣＨ１、ヒンジ領域、ＣＨ２、ＣＨ３又はＦｃを含み、選択可能的に、上記重鎖定常領域は、ヒト又はマウスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４定常領域から選られ、上記軽鎖定常領域は、ヒト又はマウスκ定常領域若しくはλ定常領域から選られ、選択可能的に、上記抗体又はその抗原結合断片は、完全な重鎖と軽鎖を含み、上記重鎖は、上記ＶＨと重鎖定常領域からなり、上記重鎖定常領域は、配列番号５、３９又は７３に示されるアミノ酸配列を有し、上記軽鎖は、上記ＶＬと軽鎖定常領域からなり、上記軽鎖定常領域は、配列番号６に示されるアミノ酸配列を有する。

30

【００４８】

幾つかの実施形態において、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩であって、そのうち、 n は、１～１６の実数から選られ、例えば、 n は、２～１２の実数から選られ、例えば、 n は、４～１０の実数から選られ、例えば、 n は、５～９の実数から選られ、例えば、 n は、６～８の実数から選ばれる。

【００４９】

幾つかの実施形態において、 n は、５～９の実数から選られ、例えば、 n は、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、８．９又は９．０である。

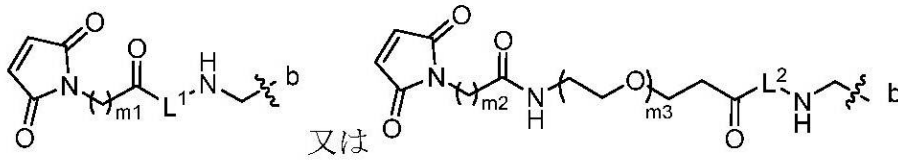
40

【００５０】

本開示は、一般構造式が $L'-D$ である薬物ーリンカー化合物又はその薬学的に許容される塩を更に提供し、そのうち、薬物ユニット D は、上記の何れかで定義される通りであり、 L' は、

50

【化 1 5】



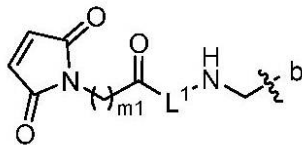
から選られ、そのb末端は薬物ユニットDに共有結合しており、 L^1 、 L^2 、 m_1 、 m_2 、 m_3 は、上記の何れかで定義される通りである。

10

【0051】

幾つかの実施形態において、 L' は、

【化 1 6】



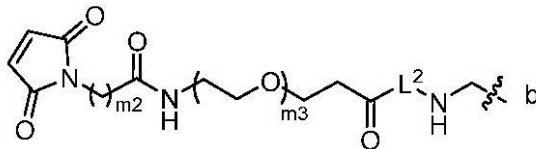
から選られ、そのb末端は薬物ユニットDに共有結合しており、 m_1 は5から選られ、 L^1 は、Gly-Gly-Phe-Glyテトラペプチド残基又はAla-Ala-Alaトリペプチド残基から選ばれる。

20

【0052】

幾つかの実施形態において、 L' は、

【化 1 7】



30

から選られ、そのb末端は薬物ユニットDに共有結合しており、 m_2 は2から選られ、 m_3 は8から選られ、 L^2 は、Gly-Gly-Phe-Glyテトラペプチド残基又はVal-Lysジペプチド残基から選ばれる。

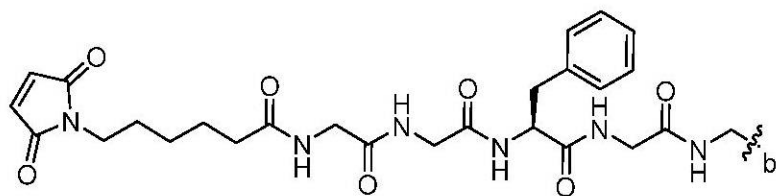
【0053】

幾つかの実施形態において、 L' は、下記の化学構造：

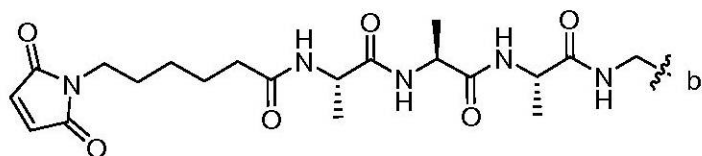
40

50

【化 1 8】

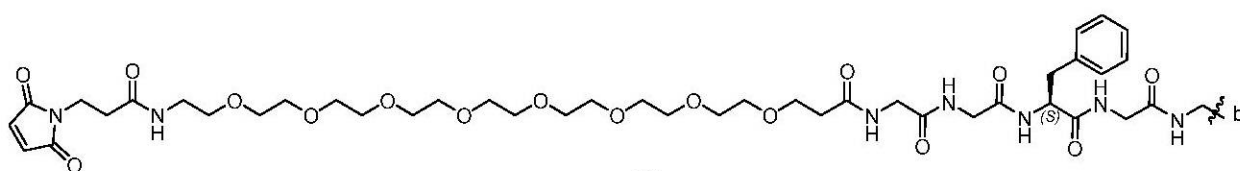


L'1



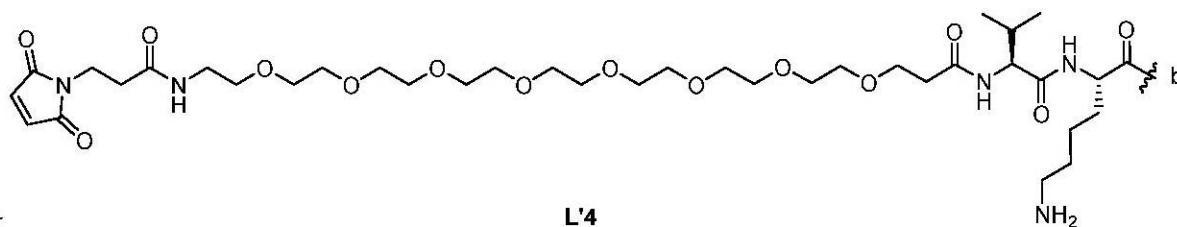
L'2

10



L'3

20



L'4

又は

のうちの1つから選ばれ、そのb末端は薬物ユニットDに共有結合している。

30

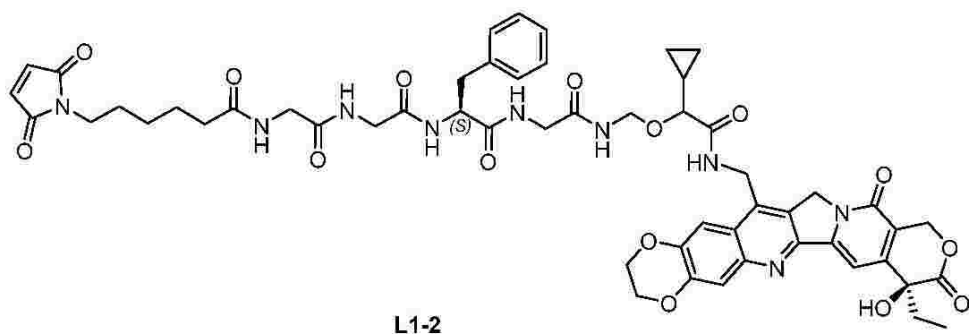
【0054】

幾つかの実施形態において、本開示の一般式がL'-Dである薬物-リンカー化合物又はその薬学的に許容される塩は、下記化合物又はその薬学的に許容される塩：

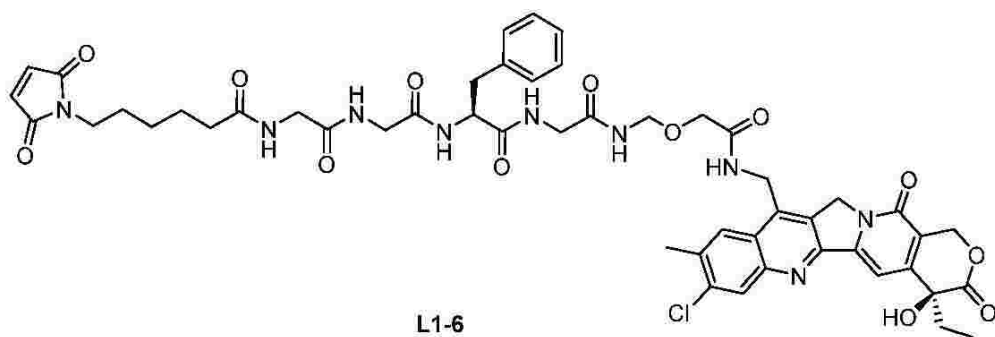
40

50

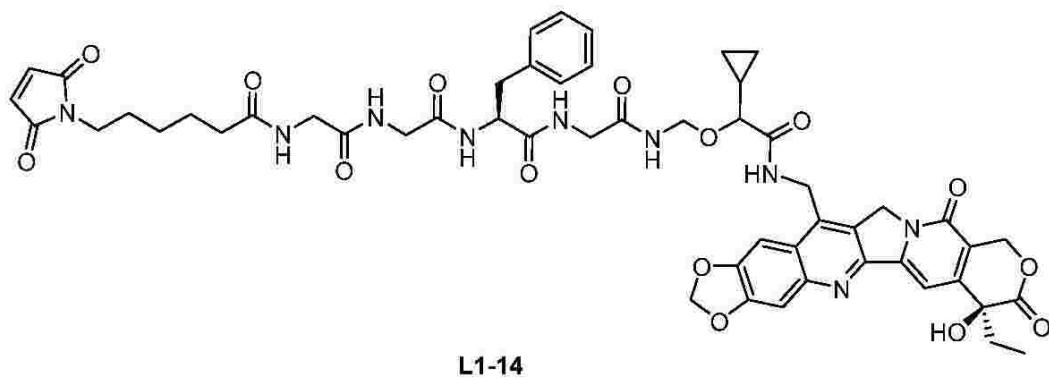
【化 1 9】



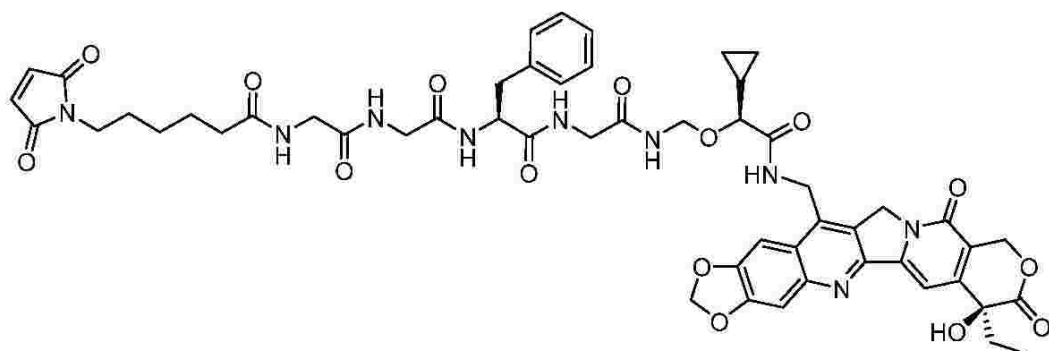
10



20

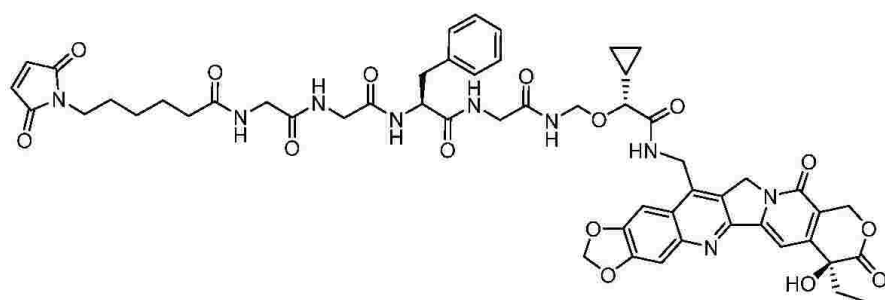


30

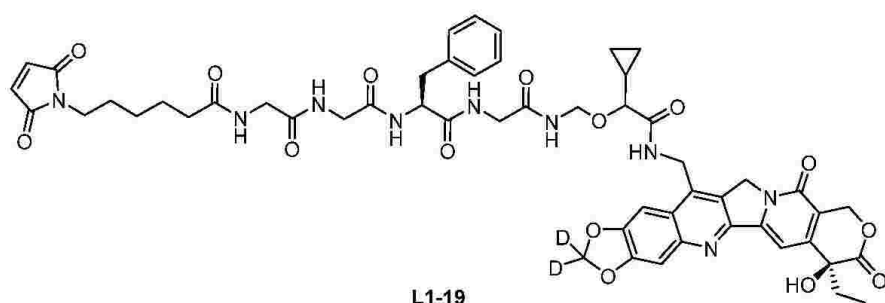


40

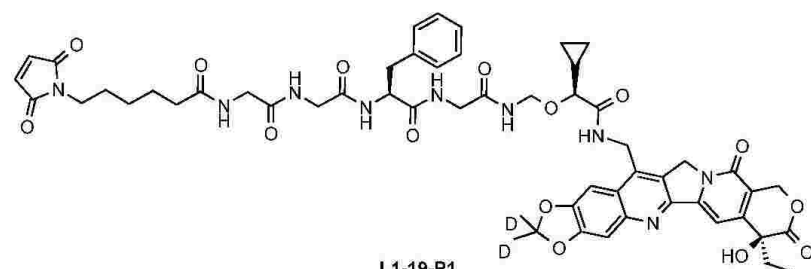
50



10

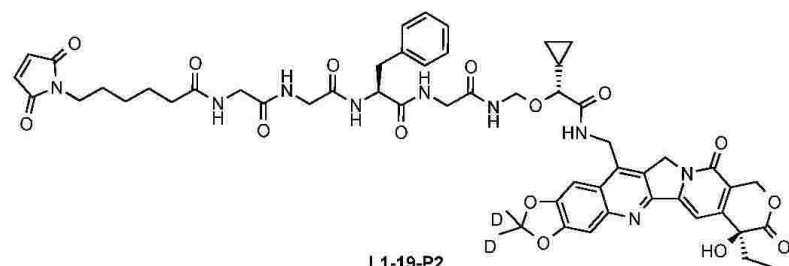


L1-19



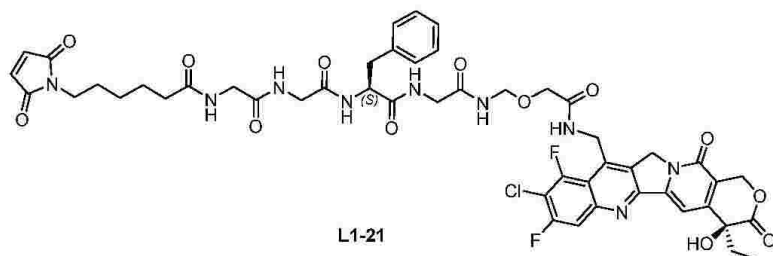
L1-19-P1

20



L1-19-P2

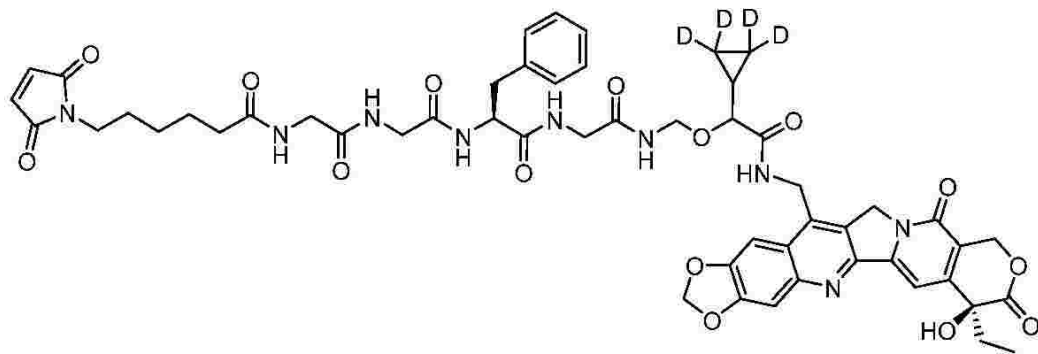
30



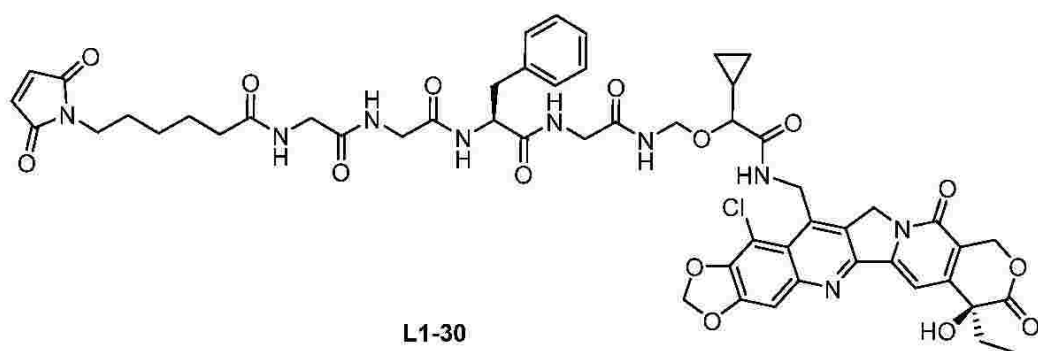
L1-21

40

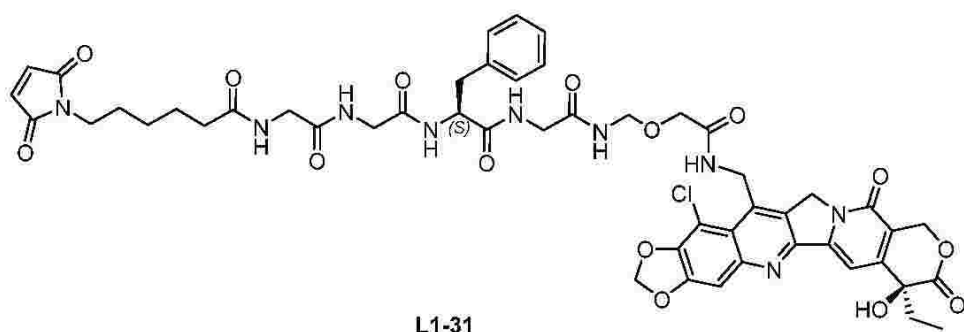
50



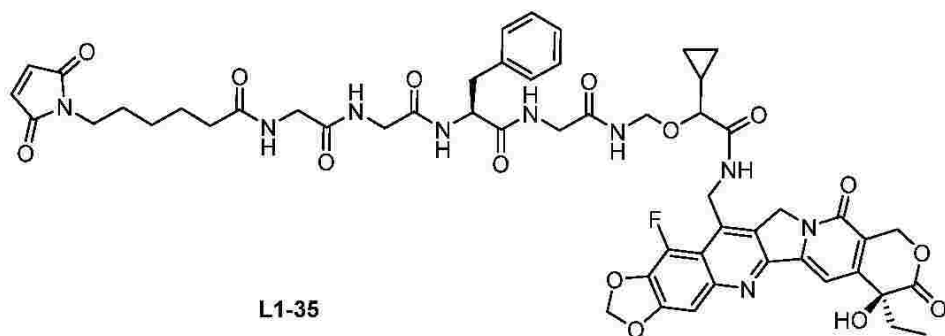
10



20

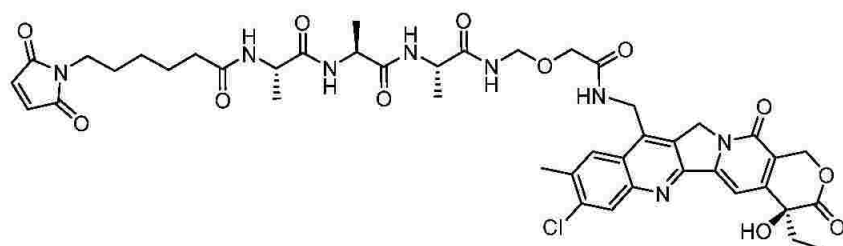


30

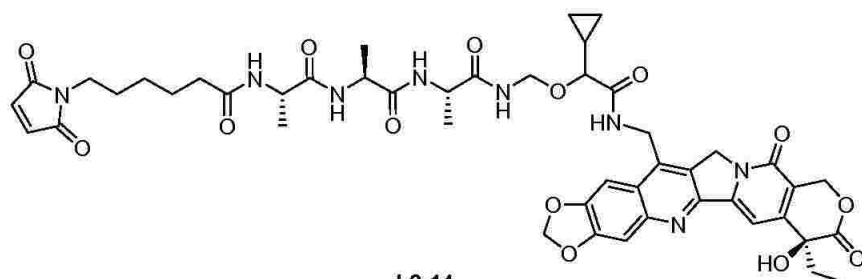


40

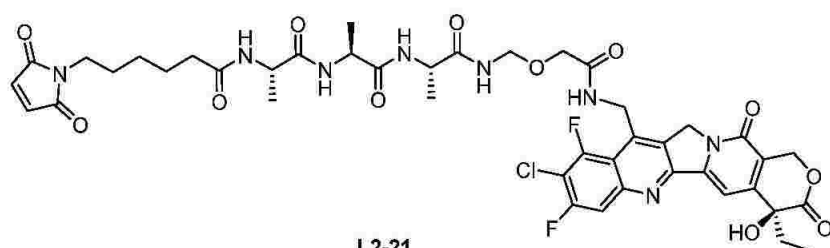
50



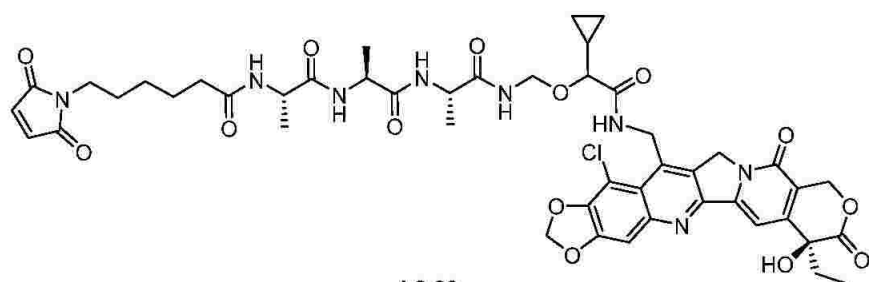
L2-6



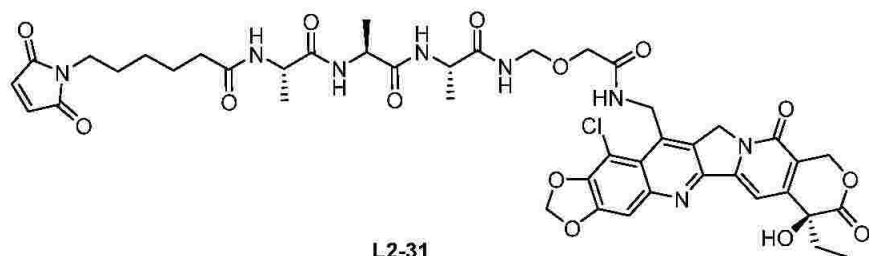
L2-14



L2-21



L2-30



L2-31

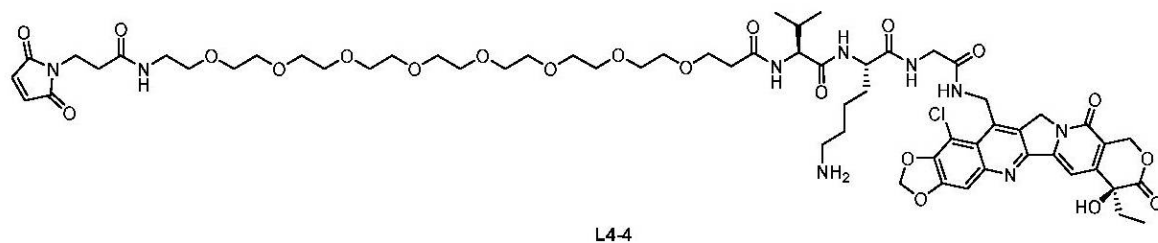
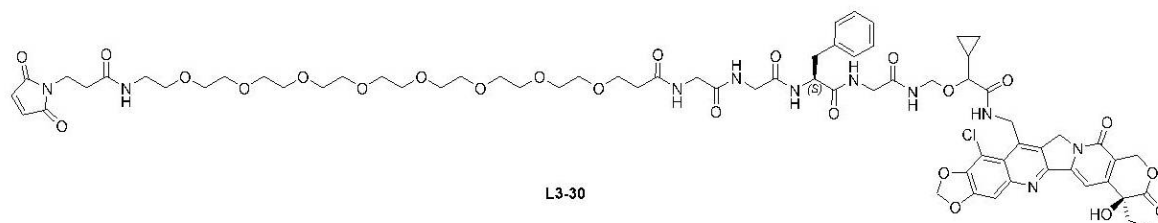
10

20

30

40

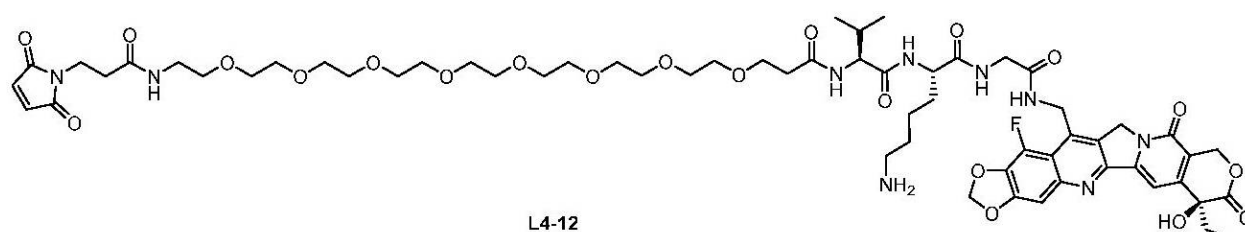
50



又は

10

20

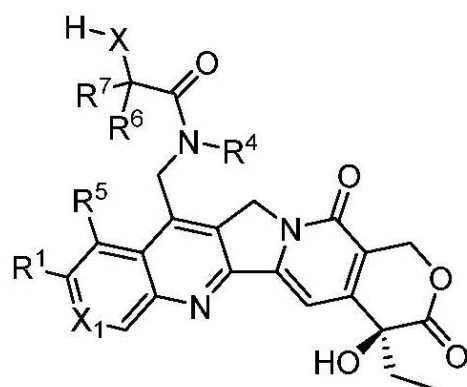


から選ばれる。

【0055】

本開示は、下記式（D－H）で示される化合物又はその薬学的に許容される塩を更に提供し、

【化20】



(D－H)

30

40

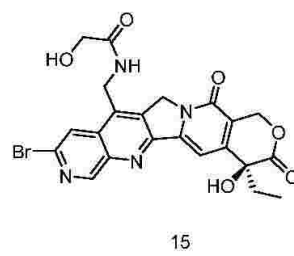
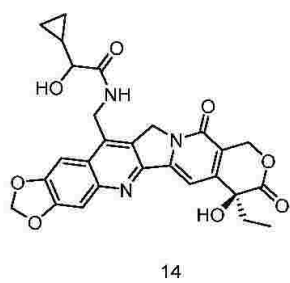
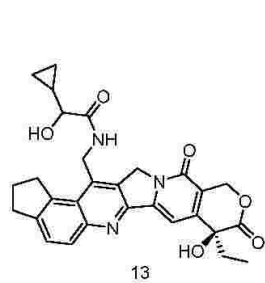
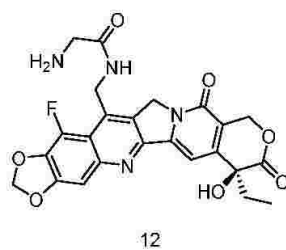
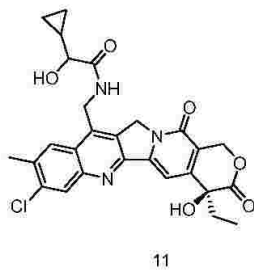
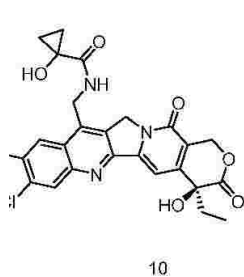
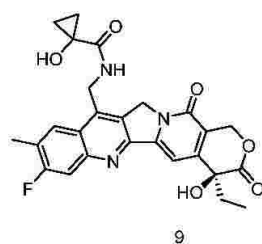
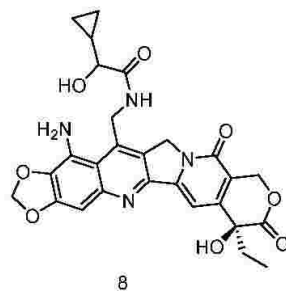
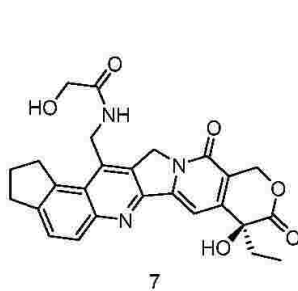
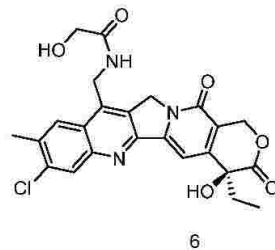
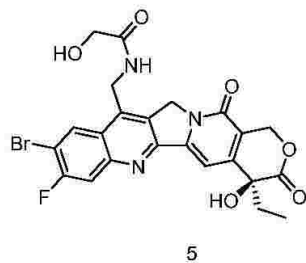
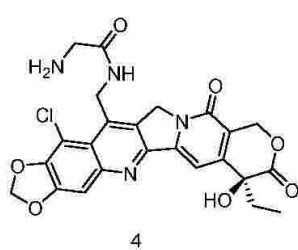
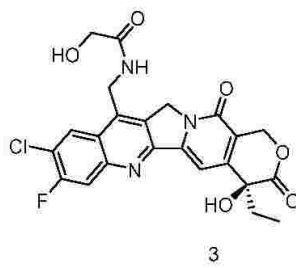
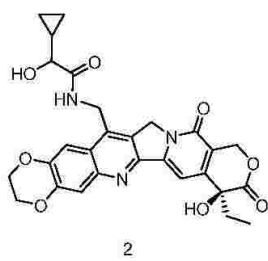
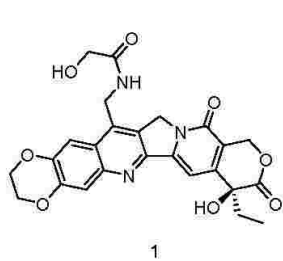
そのうち、

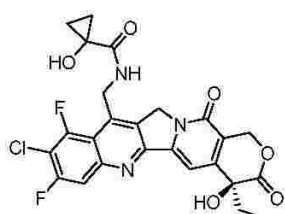
R^1 、 X_1 、 X 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 は、上記の何れかで定義される通りである。

【0056】

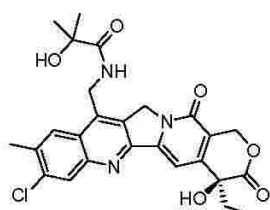
幾つかの実施形態において、式（D－H）で示される化合物又はその薬学的に許容される塩は、下記に示される化合物又はその薬学的に許容される塩：

【化 2 1】

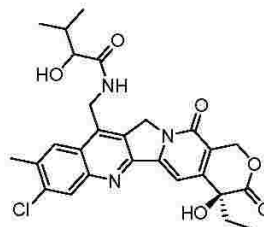




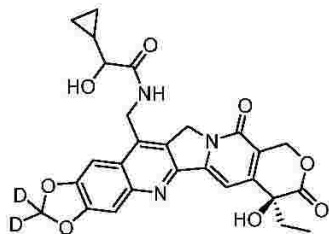
16



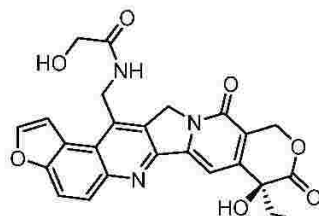
17



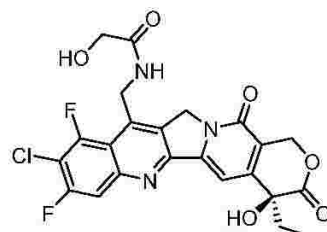
18



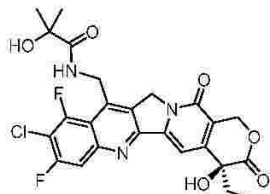
19



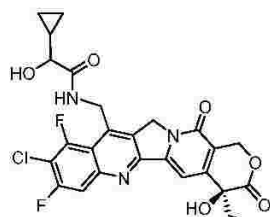
20



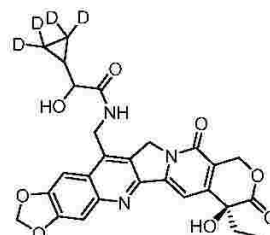
21



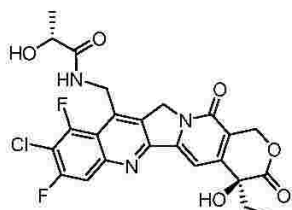
22



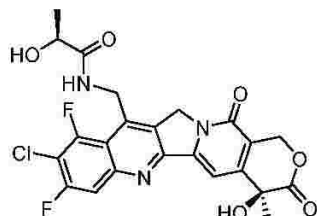
23



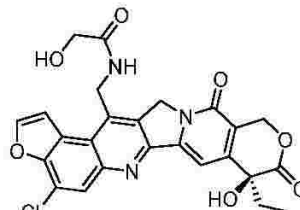
24



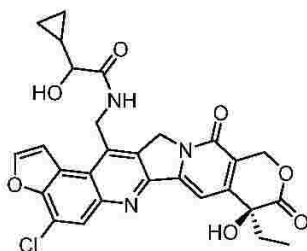
25



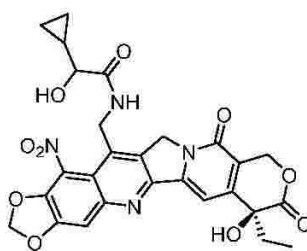
26



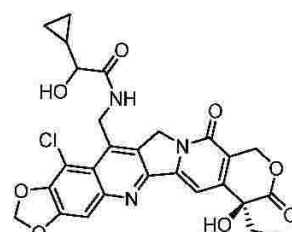
27



28



29



30

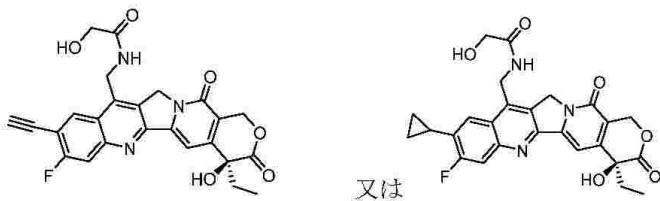
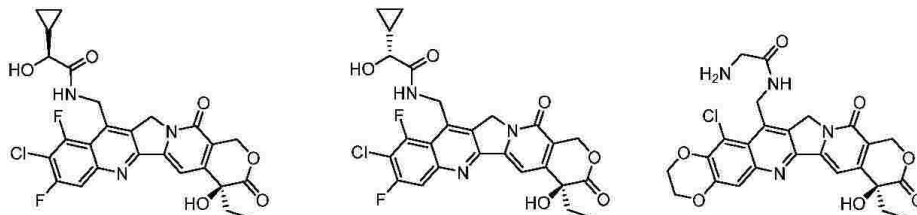
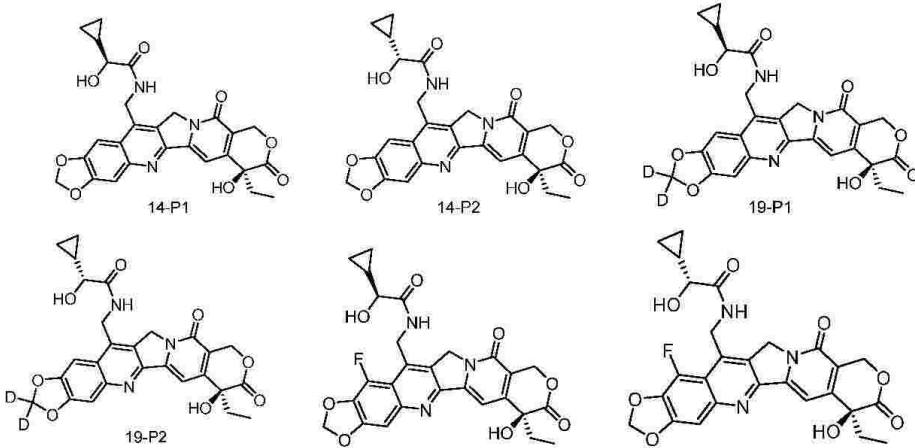
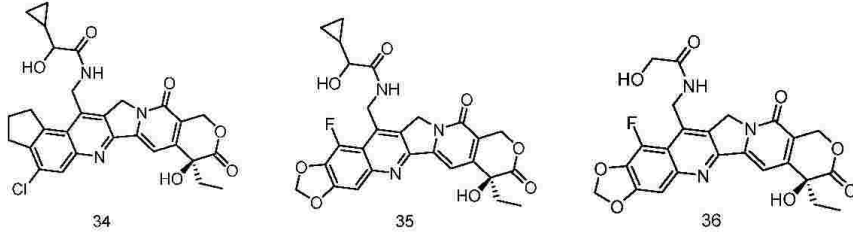
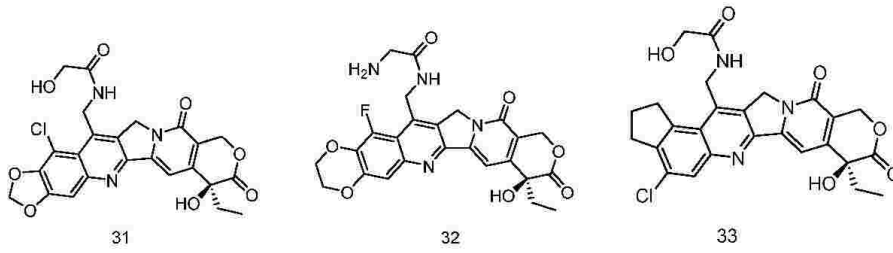
10

20

30

40

50



から選ばれる。

【0057】

別の態様では、本開示は、本開示の上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される添加物とを含む医薬組成物を提供する。

【0058】

別の態様では、本開示は、哺乳動物における腫瘍を治療する方法であって、当該治療を必要とする哺乳動物、好ましくはヒトに、治療有効量の、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物を投

10

20

30

40

50

与することを含む方法を提供する。

【0059】

別の態様では、本開示は、腫瘍を治療する薬物の製造における、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物の用途を提供する。

【0060】

別の態様では、本開示は、腫瘍の治療における、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物の用途を提供する。

【0061】

別の態様では、本開示は、腫瘍を治療する、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物を提供する。

【0062】

別の態様では、本開示は、本開示の上記式 (D-H) で示される化合物又はその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される添加物とを含む医薬組成物を提供する。

【0063】

別の態様では、本開示は、哺乳動物における腫瘍を治療する方法であって、当該治療を必要とする哺乳動物、好ましくはヒトに、治療有効量の、上記式 (D-H) で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0064】

別の態様では、本開示は、腫瘍を治療する薬物の製造における、上記式 (D-H) で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物の用途を提供する。

【0065】

別の態様では、本開示は、腫瘍の治療における、上記式 (D-H) で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物の用途を提供する。

【0066】

別の態様では、本開示は、腫瘍を治療する、上記式 (D-H) で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、或いはその医薬組成物を提供する。

【0067】

別の態様では、本開示は、一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩の製造方法であって、本開示の上記一般式が $L'-D$ である薬物ーリンカー化合物を上記リガンドとカップリングさせるステップを含み、選択可能に、上記リガンドは抗体又はその抗原結合断片である、方法を提供する。

【0068】

別の態様では、本開示は、一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体又はその薬学的に許容される塩の製造方法であって、本開示の上記薬物ユニット D を上記リガンドユニット Pc に連結するステップを含み、選択可能に、上記リンカーユニット L を介して連結し、選択可能に、リガンドは抗体又はその抗原結合断片である、方法を提供する。

【0069】

別の態様では、本開示は、上記一般式が $Pc-(L-D)_n$ であるリガンドー薬物複合体若しくはその薬学的に許容される塩の製造における、上記式 (D-H) で示される化合物若しくはその薬学的に許容される塩の用途、及び／又は上記一般式が $L'-D$ である薬物ーリンカー化合物若しくはその薬学的に許容される塩の製造における、上記式 (D-H) で示される化合物若しくはその薬学的に許容される塩の用途を提供する。

【0070】

本開示により提供されるリガンドー薬物複合体は、顕著な抗炎症活性及び／又は低減された毒性と副作用を有する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0071】

【図1】化合物19-P1のX線単結晶回折分析結果を示す。

【図2】OVCA R3皮下腫瘍モデルの腫瘍増殖曲線を示す。

【図3】OVCA R3皮下腫瘍モデルの腫瘍増殖曲線を示す。

【図4】OVCA R3皮下腫瘍モデルの腫瘍増殖曲線を示す。

【図5】OVCA R3皮下腫瘍モデルのマウス体重変化曲線を示す。

【図6】H838皮下腫瘍モデルの腫瘍増殖曲線を示す。

【図7】H838皮下腫瘍モデルマウスの体重変化曲線を示す。

【0072】

用語の定義及び説明

特に説明のない限り、本開示で使用される用語は、以下の意味を有し、本開示に記載の基と用語の定義は、その実例としての定義、例示的な定義、好ましい定義、表に記載される定義、実施例における具体的な化合物の定義などを含み、互いに任意に組み合わせたり、結合したりすることができる。1つの特定の用語は、特別に定義されていない場合に、不確定又は不明瞭であるとみなされるべきではなく、当技術分野における一般的な意味に従って理解されるべきである。本明細書に商品名が現れる場合、その対応する商品又はその活性成分を指すことを意図する。

【0073】

「リガンド」という用語は、標的細胞に関連する抗原又は受容体を認識したり、それに結合したりすることができる高分子化合物を指す。リガンドの作用は、薬物をリガンドに結合される目標細胞群に伝達することであり、これらのリガンドは、タンパク質ホルモン、レクチン、成長因子、抗体、又は細胞に結合することができる他の分子を含むが、これらに限定されない。本開示の実施形態において、リガンド又はリガンドユニットは、Pcと表され、リガンドは、リガンド上のヘテロ原子を介してリンカーユニットと連結結合を形成することができる。本開示の幾つかの実施形態において、リガンドは、抗体又は抗原結合断片から選ばれ、上記抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又はマウス抗体から選ばれ、本開示の幾つかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0074】

「リンカー」又は「リンカーユニット」という用語は、一端がリガンドに連結され、他端が薬物に連結される化学構造断片又は化学結合を指す。

【0075】

「薬物」という用語は、生体内で生物学的活性を有する小分子化合物を指す。本開示の幾つかの実施形態において、薬物は、抗炎症機能を有するグルココルチコイド受容体アゴニスト又はその対応するリン酸エステル分子である。

【0076】

「リガンドー薬物複合体」という用語は、リガンドが安定なリンカーユニットを介して生物学的活性を有する薬物に連結されるものを指す。本開示の幾つかの実施形態において、「リガンドー薬物複合体」は、抗体ー薬物複合体 (antibody drug conjugate、ADC) であり、ADCは、モノクローナル抗体又は抗体断片を、安定なリンカーユニットを介して、生物学的活性を有する薬物に連結するものを指す。

【0077】

「DAR」又は「薬物抗体比」という用語は、各抗体分子に連結する小分子グルココルチコイド受容体アゴニスト薬物の平均数を指す。本開示の抗体ー薬物複合体において、DARは、変量「n」によって定義され、nは整数であってもよく、小数であってもよい。

【0078】

「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、免疫グロブリン重鎖可変領域由来の十分な配列及び／又は免疫グロブリン軽鎖可変領域由来の十分な配列を含むことにより、抗原に特異的に結合することができるポリペプチド又はポリペプチドの組み合わせを指す。本明細書における「抗体」は、所望の抗原結合活性を示す限り、様々な形態及び様々な構造をカバーする。本明細書における「抗体」は、移植された相補性決定領域 (CDR) 又

10

20

30

40

50

はCDR誘導体を有する代替タンパク質足場又は人工足場を含む。そのような足場は、抗体誘導足場（それは、例えば、抗体の三次元構造を安定化するように導入された突然変異を含む）、及び例えば、生体適合性ポリマーを含む完全合成足場を含む。例えば、Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53 (1): 121~129 (2003)、Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20: 639~654 (2004)を参照する。そのような足場は、非抗体誘導足場、例えば、テネシン、フィブロネクチン、ペプチドアプタマーなどを含むが、これらに限定されない、CDRの移植に用いることができる当技術分野で公知の足場タンパク質を更に含んでもよい。

10

【0079】

本明細書における「抗体」は、2本の重鎖（HC）及び2本の軽鎖（LC）からなる免疫グロブリンに属する典型的な「四本鎖抗体」を含み、重鎖は、N末端からC末端へ方向に、重鎖可変領域（VH）、重鎖定常領域CH1ドメイン、ヒンジ領域（HR）、重鎖定常領域CH2ドメイン、重鎖定常領域CH3ドメインからなるポリペプチド鎖を指し、且つ、上記全長抗体がIgEアイソタイプである場合、任意選択的に、重鎖定常領域CH4ドメインを更に含み、軽鎖は、N末端からC末端へ方向に、軽鎖可変領域（VL）及び軽鎖定常領域（CL）からなるポリペプチド鎖であり、重鎖と重鎖の間、重鎖と軽鎖の間はジスルフィド結合を介して連結されており、「Y」字型構造を形成している。免疫グロブリンは、重鎖定常領域のアミノ酸組成と配列順序が異なるので、その抗原性も異なる。これにより、本明細書における「免疫グロブリン」は、5つのクラス、又は、免疫グロブリンのアイソタイプと呼ばれるIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEに分けることができ、それらの対応する重鎖は、それぞれμ鎖、δ鎖、γ鎖、α鎖及びε鎖である。同一クラスのIgは、そのヒンジ領域のアミノ酸組成及び重鎖ジスルフィド結合の数と位置の違いによって、更に異なるサブクラスに分けることができ、例えば、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4に分けることができ、IgAは、IgA1とIgA2に分けることができる。軽鎖は、定常領域の違いによって、κ鎖又はλ鎖に分けられる。5つのクラスのIgのうちの各クラスのIgは、何れもκ鎖又はλ鎖を有してもよい。

20

【0080】

本明細書における「抗体」は、軽鎖を含まない抗体、例えば、ヒトコブラクダ（*Camelus dromedarius*）、フタコブラクダ（*Camelus bactrianus*）、ラマ（*Lama glama*）、グアナコ（*Lama guanicoe*）及びアルパカ（*Vicugna pacos*）などによって産生される重鎖抗体（heavy-chain antibodies, HCABs）、並びにサメなどの軟骨魚綱において見出される免疫グロブリン新抗原受容体（Ig new antigen receptor, IgNAR）を更に含む。

30

【0081】

本明細書における「抗体」は、ヒト及び非ヒト動物を含むが、これらに限定されない任意の動物に由来してもよく、上記非ヒト動物は、霊長類動物、哺乳動物、齧歯動物及び脊椎動物、例えば、ラクダ科動物、ラマ、グアナコ、アルパカ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット又は軟骨魚綱（例えば、サメ）から選ばれてもよい。

40

【0082】

本明細書における「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、一価抗体、多価抗体、完全抗体、完全抗体の断片、裸の抗体、複合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又は完全ヒト抗体を含むが、これらに限定されない。

【0083】

「モノクローナル抗体」という用語は、基本的に同質の抗体集団から得られた抗体を指し、即ち、可能な変異体（例えば、天然に存在する突然変異を含むか、又は製剤の製造過程中に産生され、このような変異体は、通常、少量で存在する）を除いて、上記集団を含む

50

個々の抗体は同じであり、及び／又は同じエピトープに結合する。通常、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクローナル抗体製剤中の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。本明細書における「モノクローナル」という修飾語は、任意の特定の方法により上記抗体又は抗原結合分子を産生することを必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換えDNA法、ファージライブラリディスプレイ技術、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法、並びに当技術分野で公知の他の方法を含む（これらに限定されない）、様々な技術によって作製され得る。

【0084】

10

「天然抗体」という用語は、多細胞生物の免疫系によって産生及びペアリングされる抗体を指す。本明細書における「工学操作された抗体」という用語は、遺伝子工学、抗体工学などの技術によって得られる非天然抗体を指し、例示的に、「工学操作された抗体」は、ヒト化抗体、小分子抗体（例えば、scFvなど）、二重特異性抗体などを含む。

【0085】

「単一特異性」という用語は、1つ又は複数の結合部位を有することを示し、そのうち、各結合部位が同じ抗原の同じエピトープに結合することを指す。

【0086】

「多重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの抗原結合部位を有するものを指し、上記少なくとも2つの抗原結合部位のうちの各抗原結合部位は、同じ抗原の異なるエピトープ又は異なる抗原の異なるエピトープに結合する。従って、例えば「二重特異性」、「三重特異性」、「四重特異性」などの用語は、抗体／抗原結合分子が結合できる異なるエピトープの数を指す。

20

【0087】

「価」という用語は、抗体／抗原結合分子中の所定数の結合部位の存在を示す。従って、「一価」、「二価」、「四価」及び「六価」という用語は、それぞれ抗体／抗原結合分子中の1つの結合部位、2つの結合部位、4つの結合部位及び6つの結合部位の存在を示す。

【0088】

本明細書における「全長抗体」、「無傷抗体」及び「完全抗体」は、本明細書において互換的に使用されてもよく、天然抗体の構造と基本的に類似する構造を有するものを指す。

30

【0089】

本明細書における「抗原結合断片」及び「抗体断片」は、本明細書において互換的に使用されてもよく、完全抗体の全ての構造を有さず、完全抗体の局所又は局所の変異体のみを含み、上記局所又は局所の変異体は、抗原に結合する能力を有する。本明細書における「抗原結合断片」又は「抗体断片」は、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、VHH及びscFvを含むが、これらに限定されない。

【0090】

完全抗体のパイン消化は、それぞれ重鎖と軽鎖可変ドメイン含み、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を更に含む、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生成する。従って、本明細書における「Fab断片」という用語は、軽鎖のVLドメインと定常ドメイン（CL）の軽鎖断片、及び重鎖のVHドメインと第1の定常ドメイン（CH1）の抗体断片を含むものを指す。Fab'断片は、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に少数の残基が増加するため、Fab断片とは異なり、抗体ヒンジ領域に由来する1つ又は複数のシステインを含む。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持するFab'断片である。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位（2つのFab断片）及びFc領域の一部を有するF(ab')₂断片を産生する。

40

【0091】

「Fv断片」は、IgG及びIgMにより産生される最小断片であり、完全な抗原結合部

50

位を含み、Fv断片は、Fabと同じ結合特性及び類似の三次元結合特性を有し、Fv断片のVH鎖とVL鎖は、非共有相互作用によって一緒に結合している。

【0092】

「scFv」(single-chain variable fragment)という用語は、VLとVHドメインを含む単一のポリペプチド鎖を指し、そのうち、上記VLとVHはリンカー(linker)によって連結されている(例えば、Bird et al., Science 242:423~426 (1988)、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883 (1988)、及びPluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113巻, RoseburgとMoore編集, Springer-Verlag, ニューヨーク, 第269~315ページ(1994)を参照する)。そのようなscFv分子は、一般構造: NH₂-VL-リンカー-VH-COOH又はNH₂-VH-リンカー-VL-COOHを有することができる。適切な従来技術のリンカーは、反復のGGGGSアミノ酸配列又はその変異体からなる。例えば、アミノ酸配列(GGGGS)4を有するリンカーを使用することができるが、その変異体を使用することもできる(Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444~6448)。本開示に使用可能な他のリンカーは、Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725~731、Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94~106、Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055~3061、Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41~56及びRoovers et al. (2001), Cancer Immunol.に記載されている。幾つかの場合において、scFvのVHとVLとの間にジスルフィド結合が存在し、ジスルフィド結合により連結されるFv(dsFv)が形成されてもよい。

【0093】

「二重抗体(diabody)」という用語は、そのVHとVLドメインが単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、短すぎるリンカーを使用することによって同じ鎖の2つのドメインの間でのペアリングが許容されなく、それによりドメインは別の鎖の相補的ドメインと余儀なくペアリングされ、且つ2つの抗原結合部位が産生される(例えば、Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444~6448 (1993)、及びPoljak R. J. et al., Structure 2:1121~1123 (1994)を参照する)。

【0094】

「キメラ抗体(Chimeric antibody)」という用語は、その軽鎖又は／及び重鎖の一部が1つの抗体(それは、ある特定の種に由来するか、又はある特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属してもよい)に由来し、且つ軽鎖又は／及び重鎖の別の一部が別の抗体(それは、同じ又は異なる種に由来するか、或いは同じ又は異なる抗体クラス若しくはサブクラスに属してもよい)に由来するが、何れにせよ、標的抗原に対する結合活性を保持する抗体を指す(U. S. P 4,816,567 to Cabilly et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。例えば、「キメラ抗体」という用語は、抗体の重鎖と軽鎖可変領域が第1の抗体(例えば、マウス抗体)に由来し、抗体の重鎖と軽鎖定常領域が第2の抗体(例えば、ヒト抗体)に由来する抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ抗体)を含んでもよい。

【0095】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体との配列相同性を高めるためにアミノ酸配列が修飾された、遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。一般的に言えば、ヒト化抗体のCDR領域の全部又は一部は、非ヒト抗体(ドナー抗体)に由来し、非CDR領域の全部又は一部(例えば、可変領域中のFR及び／又は定常領域)は、ヒト免疫グロブリン(アクセプタ

10

20

30

40

50

一抗体)に由来する。ヒト化抗体は通常、抗原特異性、親和性、反応性、免疫細胞活性を増強する能力、免疫応答を増強する能力などを含むが、これらに限定されないドナー抗体の予想される性質を保持するか、又は部分的に保持する。

【0096】

「完全ヒト抗体」という用語は、FRとCDRの両方もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を指す。更に、抗体が定常領域を含むと、定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本明細書における「完全ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的変異誘発によって、又はインビボでの体細胞突然変異によって導入される突然変異)を含んでもよい。しかしながら、本明細書における「完全ヒト抗体」は、別の哺乳動物種(例えば、マウス)の生殖細胞系に由来するCDR配列が既にヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含まない。

10

【0097】

「可変領域」という用語は、抗体の重鎖又は軽鎖に含まれる、抗体が抗原に結合するようにする領域を指し、「重鎖可変領域」は、「VH」、「HCVR」と互換的に使用されてもよく、「軽鎖可変領域」は、「VL」、「LCVR」と互換的に使用されてもよい。天然抗体の重鎖と軽鎖の可変ドメイン(それぞれVHとVLである)は、一般的に、類似の構造を有し、各ドメインは4つの保存的なフレームワーク領域(FR)及び3つの超可変領域(HVR)を含む。例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 6th edition, W. H. Freeman and Co., p. 91 (2007)を参照する。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。本明細書における「相補性決定領域」及び「CDR」という用語は互換的に使用されてもよく、一般的に、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)の超可変領域(HVR)を指し、当該部位は空間構造において抗原エピトープと精密な相補を形成することができるため、相補性決定領域とも呼ばれ、そのうち、重鎖可変領域CDRはHCDRと略記されてもよく、軽鎖可変領域CDRはLCDRと略記されてもよい。本明細書における「フレームワーク領域」又は「FR領域」という用語は、互換してもよく、抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域中のCDR以外のアミノ酸残基を指す。一般的に、典型的な抗体可変領域は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で、4つのFR領域と3つのCDR領域とからなる。

20

30

【0098】

本明細書における「CDR」は、Kabatt番号付けシステム、Chothia番号付けシステム、又はIMGT番号付けシステムを含むが、これらに限定されない、当技術分野で周知の方式で表記及び定義することができ、使用されるツールウェブサイトは、AbRSAウェブサイト(<http://cao.labshare.cn/AbRSA/cdrs.php>)、abYsisウェブサイト(www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)、及びIMGTウェブサイト(<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi#results>)を含むが、これらに限定されない。本明細書におけるCDRは、異なる定義方式のアミノ酸残基の重複(overlap)及びサブセットを含む。

40

【0099】

本明細書における「重鎖定常領域」という用語は、抗体と抗原との結合に直接関与しないが、Fc受容体との相互作用などのエフェクター機能を示す、抗体重鎖のカルボキシ末端部分を指し、抗体の可変ドメインと比較して、より保存的なアミノ酸配列を有する。「重鎖定常領域」は、少なくともCH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、又はそれらの変異体若しくは断片を含む。「重鎖定常領域」には「全長重鎖定常領域」と「重鎖定常領域断片」が含まれ、前者は天然抗体定常領域と基本的に類似する構造を有し、後者は「全長重鎖定常領域の一部」のみを含む。例示的に、典型的な「全長抗体重鎖定常領域」は、CH1ドメイン-ヒンジ領域-CH2ドメイン-CH3ドメインから

50

なり、抗体が I g E である場合、C H 4 ドメインを更に含み、抗体が重鎖抗体である場合、C H 1 ドメインを含まない。例示的に、典型的な「重鎖定常領域断片」は、C H 1、F c 又は C H 3 ドメインから選ばれてもよい。

【0100】

本明細書における「軽鎖定常領域」という用語は、抗体と抗原との結合に直接関与しない、抗体軽鎖のカルボキシ末端部分を指し、上記軽鎖定常領域は、定常κドメイン又は定常λドメインから選ばれてもよい。

【0101】

本明細書における「F c」という用語は、完全抗体のパパイン加水分解によってなる抗体のカルボキシ末端部分を指し、典型的に、それは抗体のC H 3とC H 2ドメインを含む。F c領域は、例えば天然配列F c領域、組換えF c領域及び変異体F c領域を含む。免疫グロブリン重鎖のF c領域の境界はわずかに変化することができるが、ヒトI g G重鎖のF c領域は通常、C y s 2 2 6位置でのアミノ酸残基から、又はP r o 2 3 0から、そのカルボキシ末端まで延びるように定義される。F c領域のC末端リジン（K a b a t 番号付けシステムの残基447に基づくもの）は、例えば、抗体の産生又は精製過程中に、又は抗体重鎖をコードする核酸に対して組換え操作を行うことによって除去することができ、従って、F c領域はL y s 4 4 7を含んでも含まなくてもよい。

【0102】

本明細書における「同一性」という用語は、2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の「同一性」パーセントを決定するように、上記配列を最適な比較という目的のためにアラインメントする（例えば、最適なアラインメントのために、第1と第2のアミノ酸配列又は核酸配列の一方若しくは両方にギャップを導入してもよく、或いは比較目的のために非相同配列を捨ててもよい）ことによって、計算されてもよい。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置における同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められている場合、上記分子はこの位置において同じである。

【0103】

それらの2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮すると、2つの配列の間の同一性パーセントは、上記配列が共有している同じ位置の変化に応じて変化する。

【0104】

数学的アルゴリズムを用いて、2つの配列間の配列比較及び同一性パーセントの計算を実現することができる。例えば、2つのアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、G C G ソフトウェアパッケージのG A P プログラムに統合されたN e e d l e m a 及びW u n s c h ((1 9 7 0) J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 4 ~ 4 5 3) アルゴリズム (w w w . g c g . c o m にて取得可能) により、B l o s s u m 6 2 マトリックス又はP A M 2 5 0 マトリックス、及びギャップ重み16、14、12、10、8、6又は4と長さ重み1、2、3、4、5又は6を使用して決定される。また例えば、2つのヌクレオチド配列の間の同一性パーセントは、G C G ソフトウェアパッケージ中のG A P プログラム (w w w . g c g . c o m にて取得可能) により、N W S g a p d n a . C M P マトリックス及びギャップ重み40、50、60、70又は80と長さ重み1、2、3、4、5又は6を使用して決定される。特に好ましいパラメータセット（及び特に断りのない限り、使用されるべき1つのパラメータセット）は、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、及びフレームシフトギャップペナルティ5のB l o s s u m 6 2 スコアリングマトリックスを採用する。

【0105】

本明細書における「nは1～16の実数である」は、nが1以上且つ16以下の任意の実数であることを指す。

【0106】

本明細書における

【化 2 2】

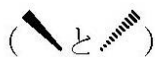


は連結部位を示す。

【0107】

本明細書におけるラセミ体又はエナンチオマー的に純粋な化合物の図示は、Maeher, J. Chem. Ed. 1985, 62: 114~120からのものである。特に断りのない限り、くさび形結合と破線のくさび形結合

【化 2 3】



で1つの立体中心の絶対配置を示し、黒い実線結合と破線結合

【化 2 4】



で1つの立体中心の相対配置（例えば、脂環式化合物のシス・トランス配置）を示す。

【0108】

「互変異性体」という用語は、分子中のある原子が2つの位置で迅速に移動することによって生じられた官能基異性体を指す。本開示の化合物は、互変異性現象を示すことができる。互変異性の化合物は、2種又は複数種の相互転化可能な種類があり得る。互変異性体は一般的に平衡形態で存在し、単一の互変異性体を分離してみる場合に、通常、物理化学的性質が化合物の混合物と一致する混合物が産生される。平衡の位置は、分子内の化学的特性によって決められる。例えば、多くの脂肪族アルデヒド及びケトン、例えばアセトアルデヒドでは、ケト型が優勢であるが、フェノールでは、エノール型が優勢である。本開示は、化合物の全ての互変異性形態を含む。

【0109】

「立体異性体」という用語は、分子中の原子の空間的配置の違いにより生じる異性体を指し、シス・トランス異性体、エナンチオマー及びジアステレオマーを含む。

【0110】

本開示の化合物は、炭素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子又は不斉二重結合などの不斉原子を有することができるので、本開示の化合物は特定の幾何異性体又は立体異性体の形態で存在することができる。特定の幾何異性体又は立体異性体の形態は、シスとトランス異性体、E型とZ型幾何異性体、(−)−と(+)-エナンチオマー、(R)-と(S)-エナンチオマー、ジアステレオマー、(D)-異性体、(L)-異性体、及びそのラセミ混合物又は他の混合物、例えば、エナンチオマーやジアステレオマーに富む混合物であってもよく、上記のこれらの異性体及びそれらの混合物の全ては、本開示の化合物の定義の範囲内に属する。アルキル基などの置換基には、他の不斉炭素原子、不斉硫黄原子、不斉窒素原子又は不斉リン原子が存在してもよく、全ての置換基に係わるこれらの異性体及びそれらの混合物も全て本開示の化合物の定義の範囲内に含まれる。本開示の不斉原子を含む化合物は、光学活性的に純粋な形態又はラセミ形態で単離されてもよく、光学活性的に純粋な形態は、ラセミ混合物から分割され、或いはキラル原料又はキラル試薬を使用することにより合成されてもよい。

【0111】

「置換される」という用語は、特定の原子の原子価が正常であり、且つ置換された化合物が安定である限り、特定の原子における何れか1つ又は複数の水素原子が置換基によって置換されることを指す。置換基がオキソ（即ち、=O）である場合、2つの水素原子が置

10

20

30

40

50

換されることを意味し、芳香族基にはオキソが発生しない。

【0112】

「任意選択的」又は「任意選択的に」という用語は、その後に説明される事象又は状況が発生し得るか、又は発生し得ないことを指し、当該説明は、上記事象又は状況が発生する場合と、発生しない場合とを含む。例えば、エチル基は「任意選択的に」ハロゲンで置換されることは、エチル基が非置換 (CH_2CH_3)、一置換 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ など)、多置換 (CHFCH_2F 、 CH_2CHF_2 、 CHFCH_2Cl 、 CH_2CHCl_2 など) 又は完全置換 (CF_2CF_3 、 CF_2CCl_3 、 CCl_2CCl_3 など) であり得ることを指す。当業者は、1つ又は複数の置換基を含む任意の基について、空間的に存在し得ない及び／又は合成できない任意の置換又は置換パターンが導入されないことが理解できる。

10

【0113】

何れかの変量 (例えば、 R^a 、 R^b) が化合物の組成又は構造において1回以上現れる場合、それぞれの場合におけるその定義は、何れも独立している。例えば、1つの基が2つの R^b で置換されると、各 R^b は独立したオプションがある。

【0114】

1つの連結基の数量が0、例えば $-(\text{CH}_2)_0-$ である場合、当該連結基が結合であることを示す。

【0115】

そのうちの1つの変量が化学結合から選ばれるか、又は存在しない場合、その連結される2つの基が直接連結されることを示し、例えば、 $A-L-Z$ において L が結合を表す場合、当該構造は実際に $A-Z$ であることを示す。

20

【0116】

本明細書に係わる連結基がその連結方向を明示していない場合、その連結方向は任意である。例えば、構造ユニット

【化25】



30

における X が「 C_1-C_3 アルキレン- O 」から選ばれる場合、この時、 X は、左から右への方向に環 A と環 B とを連結して「環 $A-C_1-C_3$ アルキレン- O -環 B 」を構成してもよく、右から左への方向に環 A と環 B とを連結して「環 $A-O-C_1-C_3$ アルキレン-環 B 」を構成してもよい。

【0117】

本明細書における C_m-C_n は、 $m \sim n$ の範囲の整数個の炭素原子を有することを指す。

【0118】

「アルキル基」という用語は、一般式が C_nH_{2n+1} である炭化水素基を指し、当該アルキル基は直鎖又は分岐鎖であってもよい。「 C_1-C_6 アルキル基」という用語は、1、2、3、4、5又は6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の飽和炭化水素基を示すと理解されるべきである。上記アルキル基は、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、イソプロピル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、イソペンチル基、2-メチルブチル基、1-メチルブチル基、1-エチルプロピル基、1,2-ジメチルプロピル基、ネオペンチル基、1,1-ジメチルプロピル基、4-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、1-メチルペンチル基、2-エチルブチル基、1-エチルブチル基、3,3-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、1,1-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基又は1,2-ジメチルブチル基などを含むが、これらに限定されず、「 C_1-C_3 アルキル基」という用語は、1～3個の炭素原子を含むアルキル基、例え

40

50

ば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基を指す。

【0119】

本明細書に記載の「 C_1-C_6 アルキル基」は、「 C_1-C_3 アルキル基」を更に含んでもよい。

【0120】

「アルキニル基」という用語は、炭素原子及び水素原子からなる、少なくとも1つの三重結合を有する直鎖又は分岐鎖の不飽和脂肪族炭化水素基を指す。例えば、「 C_2-C_6 アルキニル基」という用語は、好ましくは1つ又は複数の三重結合を含み、且つ2、3、4、5又は6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖を示す炭化水素基と理解されるべきである。「 C_2-C_6 アルキニル基」の実例は、エチニル基 ($-C\equiv CH$)、プロプ-1-イニル ($1-プロピニル基$ 、 $-C\equiv CCH_3$)、プロプ-2-イニル基 ($-CH_2C\equiv CH$)、ブト-1-イニル基、ブト-2-イニル基又はブト-3-イニル基を含むが、これらに限定されない。「 C_2-C_6 アルキニル基」には、「 C_2-C_3 アルキニル基」が含まれてもよく、「 C_2-C_3 アルキニル基」の実例は、エチニル基 ($-C\equiv CH$)、プロプ-1-イニル基 ($1-プロピニル基$ 、 $-C\equiv CCH_3$)、プロプ-2-イニル基 ($-CH_2C\equiv CH$) を含む。

10

【0121】

「シクロアルキル基」という用語は、完全飽和で、且つ単環、縮合環、架橋環又はスピロ環などの形態で存在する炭素環を指す。「 C_3-C_6 シクロアルキル基」という用語は、3～6個の炭素原子を有する飽和の単環、縮合環、スピロ環又は架橋環を示すと理解されるべきであり、具体的な実例は、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などを含むが、これらに限定されない。

20

【0122】

「シクロアルケニル基」という用語は、不完全飽和で、且つ単環、縮環、架橋環又はスピロ環などの形態で存在する非芳香族炭素環基を指す。特に断りのない限り、当該炭素環は通常に5～8員環である。「 C_5-C_7 シクロアルケニル基」という用語は、環原子数が5、6又は7であるシクロアルケニル基を指し、具体的な実例は、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサジエニル基、シクロヘプテニル基又はシクロヘプタジエニル基などを含むが、これらに限定されない。「 C_5-C_7 シクロアルケニル基」という用語には、「 C_5-C_6 シクロアルケニル基」などの範囲が含まれてもよい。「 C_5-C_6 シクロアルケニル基」という用語は、環原子数が5又は6であるシクロアルケニル基を指し、具体的な実例は、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサジエニル基などを含むが、これらに限定されない。

30

【0123】

「ヘテロシクリル基」という用語は、環原子中に1～5個のヘテロ原子又はヘテロ原子団（即ち、ヘテロ原子を含む原子団）を含む、完全飽和又は部分飽和の単環、縮合環、スピロ環又は架橋環基を指し、上記「ヘテロ原子又はヘテロ原子団」は、窒素原子 (N)、酸素原子 (O)、硫黄原子 (S)、リン原子 (P)、ホウ素原子 (B)、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-P(=O)_2-$ 、 $-P(=O)-$ 、 $-NH-$ 、 $-S(=O)(=NH)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 又は $-NH C(=O)NH-$ などを含むが、これらに限定されない。「4～7員ヘテロシクリル基」という用語は、環原子数が4、5、6又は7であるヘテロシクリル基を意味し、且つその環原子には上記から独立的に選ばれる1～3個のヘテロ原子又はヘテロ原子団が含まれる。そのうち、4員ヘテロシクリル基の実例は、アゼチジニル基、オキセタニル基を含むが、これらに限定されず、5員ヘテロシクリル基の実例は、テトラヒドロフラニル基、ジオキソリル基、ピロリジニル基、イミダゾリジニル基、ピラゾリジニル基、ピロリニル基、4,5-ジヒドロオキサゾール又は2,5-ジヒドロ-1*H*-ピロリル基を含むが、これらに限定されず、6員ヘテロシクリル基の実例は、テトラヒドロピラニル基、ピペリジニル基、モルホリニル基、ジチアニル基、チオモルホリニル基、ピペラジニル基、トリチアニル基、テトラヒドロピリジニル基又は4*H*-[1

40

50

， 3 ， 4] チアジアニル基を含むが、これらに限定されず、7員ヘテロシクリル基の実例は、ジアゼパニル基を含むが、これらに限定されない。好ましくは、「4～7員ヘテロシクリル基」には、「4～7員ヘテロシクロアルキル基」、「5～6員ヘテロシクリル基」、「5～6員ヘテロシクロアルキル基」などの範囲が含まれてもよい。

【0124】

「5～6員ヘテロアリール基」という用語は、5又は6個の環原子を有する芳香族環基を指し、且つN、O及びSから独立的に選ばれる1～3個、好ましくは1～2個のヘテロ原子を含む。特に、5～6員ヘテロアリール基は、チエニル基、フラニル基、ピロリル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリル基、イソチアゾリル基、オキサジアゾリル基、トリアゾリル基、チアジアゾリル基、ピリジル基、ピリダジニル基、ピリミジニル基、ピラジニル基又はトリアジニル基などから選ばれる。

10

【0125】

「ハロ」又は「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素を指す。

【0126】

「治療」という用語は、対象における望ましくない生理的变化又は病変、例えば癌、自己免疫疾患及びウイルス感染の進行を予防し、遅延させる（減少させる）ことを目的とする、外科手術又は薬物処置（*surgical or therapeutic treatment*）を指す。有益又は望ましい臨床結果は、症状の軽減、疾患程度の減退、安定した疾患状態（即ち、悪化しないこと）、疾患進行の遅延又は減速、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解（部分寛解でも完全寛解でも）を含むが、これらに限定されず、検出可能か検出不能かを問わない。治療を必要とする対象には、既に病症又は疾患に罹患した対象、及び病症又は疾患に罹患しやすい対象、或いは病症又は疾患を予防しようとする対象が含まれる。遅延、軽減、減退、緩和、寛解などの用語に言及する場合、その意味には解消、消失、発生しないなどの状況も含まれる。

20

【0127】

「有効量」という用語は、細胞、組織又は対象に単独で投与されるか、又は別の治療剤と組み合わせて投与された場合に、疾患の病症又はこの疾患の進行を予防又は寛解するのに有効な治療剤の量を指す。「有効量」はまた、症状を寛解する、例えば、関連する医学的状态を治療、治癒、防止若しくは寛解する、又はそれらの状態の速度増加を治療、治癒、防止若しくは寛解するのに十分な化合物の量を指す。活性成分を単独で個体に投与する場合、治療有効用量は当該成分の量だけを指す。ある組み合わせが適用される場合、治療有効用量は、組み合わせ投与、連続投与又は同時投与に関わらず、治療効果を生じさせる活性成分の組み合わせ用量を指す。

30

【0128】

「対象」という用語は、本開示に記載される特定の疾患又は病症の治療を受ける生物を指す。対象及び患者の実例は、疾患又は病症の治療を受ける哺乳動物、例えばヒト、霊長類動物（例えば、サル）又は非霊長類哺乳動物を含む。

【0129】

「治療有効量」を構成する本開示の化合物の量は、当該化合物、疾患状態及びその重症度、投与方式、並びに治療対象となる哺乳動物の年齢に応じて変化するが、当業者が自身の知識及び本開示の内容に従って日常的に決定することができる。

40

【0130】

「薬学的に許容される」という用語は、信頼できる医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激性、アレルギー反応又は他の問題や合併症がなく、合理的な利益／リスク比に見合った、ヒト及び動物の組織と接触して使用するのに適する化合物、材料、組成物及び／又は剤形に対するものである。

【0131】

「薬学的に許容される塩」という用語は、化合物と無機酸又は有機酸で形成される塩、及び化合物と無機塩基又は有機塩基で形成される塩を含む、薬学的に許容される酸又は塩基

50

の塩を指す。

【0132】

「医薬組成物」という用語は、1つ又は複数の本開示の化合物又はその塩と薬学的に許容される添加物とからなる混合物を指す。医薬組成物の目的は、有機体への本開示の化合物の投与を容易にすることである。

【0133】

「薬学的に許容される添加物」という用語は、有機体に対して明らかな刺激効果を有さず、且つ当該活性化合物の生物学的活性及び性能を損なわない添加物を指す。適切な添加物は当業者に周知のものであり、例えば炭水化物、ワックス、水溶性及び／又は水膨潤性ポリマー、親水性又は疎水性材料、ゼラチン、油、溶媒、水などである。

10

【0134】

「含む (comprise)」又は「包含する (comprise)」という単語及びその英語の変形、例えば comprises 又は comprising は、開放的且つ非排他的な意味、即ち「含むがこれに限定されない」と理解されてもよい。

【0135】

本開示は、本明細書に記載されるものと同じであるが、1つ又は複数の原子が、自然界で通常見られる原子量又は質量数と異なる原子量又は質量数を有する原子で置換された同位体標識の本開示の化合物を更に含む。本開示の化合物に結合可能な同位体の実例は、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素、ヨウ素及び塩素の同位体を含み、例えば、それぞれ ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 及び ^{36}Cl などである。

20

【0136】

幾つかの同位体標識の本開示の化合物（例えば、 ^3H と ^{14}C で標識されるもの）は、化合物及び／又は基質組織分布の分析に使用されてもよい。トリチウム化（即ち、 ^3H ）と炭素-14（即ち、 ^{14}C ）同位体は、製造の容易さと検出可能性のために、特に好ましい。 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{11}C 及び ^{18}F などの陽電子放出同位体は、基質の占有率を測定するために陽電子放射断層撮影 (PET) 研究に使用されてもよい。同位体標識の本開示の化合物は通常、以下の方案及び／又は実施例に開示されるものと類似する下記手順で、非同位体標識試薬を同位体標識試薬に置き換えることにより製造することができる。

【0137】

本開示の医薬組成物は、適切な単位剤形の滅菌溶液剤、懸濁剤又は凍結乾燥製品などの非経口投与に適用可能である。例えば、本開示の医薬組成物は、筋肉内又は皮下投与のための滅菌注射水溶液の形態であってもよい。本開示の医薬組成物は、使用時に、水、リンゲル液若しくは等張塩化ナトリウム溶液などの他の溶媒又は溶剤を許容することができる。

30

【0138】

本明細書に記載の化合物の全ての投与方法において、1日あたりに投与される用量は、単独又は分割投与の形態で $0.001\text{ mg/kg} \sim 600\text{ mg/kg}$ 体重、好ましくは $0.05\text{ mg/kg} \sim 200\text{ mg/kg}$ 体重、より好ましくは $0.1\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ 体重である。

【0139】

本開示の化合物は、当業者によく知られている複数種の合成方法により製造することができ、以下に挙げられる具体的な実施形態、それと他の化学合成方法との組み合わせで形成される実施形態及び当業者によく知られている同等置換形態を含み、好ましい実施形態は本開示の実施例を含むが、これらに限定されない。

40

【0140】

本開示の具体的な実施形態の化学反応は適当な溶媒において完成され、上記溶媒は、本開示の化学変化及びその必要な試薬と材料に適しなければならない。本開示の化合物を得るために、当業者は、既存の実施形態に基づいて合成ステップ又は反応プロセスを修正するか又は選択することを必要とする場合がある。

【0141】

50

当技術分野における合成経路の計画中の重要な考慮事項の1つは、反応性官能基（例えば、本開示におけるアミノ基、カルボキシ基）のために適切な保護基を選択することであり、例えば、Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (4th Ed). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. を参照することができ、本開示で引用される全ての参考文献は、その全体が本開示に組み込まれる。

【発明を実施するための形態】

【0142】

以下、実施例により本開示を詳しく説明するが、本開示への何らかの不利な制限を意味するものではない。本明細書は既に本開示を詳しく説明し、その具体的な実施例形態も開示されているが、当業者にとっては、本開示の精神と範囲から逸脱することなく、本開示の具体的な実施形態に対して様々な変更を行うことが明らかである。本開示に使用される全ての試薬は市販されるものであり、更に精製することなく使用することができる。

10

【0143】

特に断りのない限り、混合溶媒が表す比率は体積混合比である。

【0144】

特に断りのない限り、%はwt%を指す。

【0145】

化合物は人工又はChemDraw(R)ソフトウェアにより命名され、市販化合物は供給業者のカatalog名称を採用する。

20

【0146】

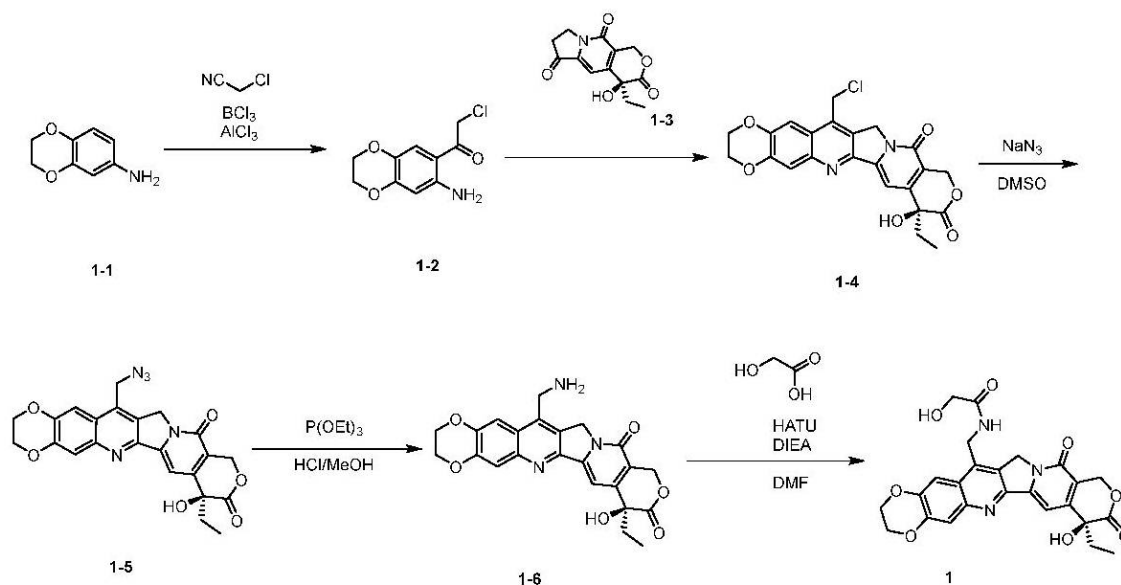
化合物の構造は、核磁気共鳴(NMR)及び／又は質量分析(MS)によって決定された。NMRシフトの単位は 10^{-6} (ppm)である。NMR測定に使用した溶媒は、重水素化ジメチルスルホキシド、重水素化クロロホルム、重水素化メタノールなどであり、内部標準はテトラメチルシラン(TMS)であり、「IC₅₀」は半数阻害濃度で、最大阻害効果の半分が達成される時の濃度を指し、「EC₅₀」は半数最大効果を可能にする濃度で、最大効果の50%をもたらす濃度を指す。

【0147】

実施例1、(S)-N-((8-エチル-8-ヒドロキシ-9,12-ジオキソ-2,3,8,9,12,14-ヘキサヒドロ-11H-[1,4]ジオキシノ[2,3-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物1)

30

【化26】



40

50

ステップ1：1-(7-アミノ-2,3-ジヒドロベンゾ[*b*][1,4]ジオキシシノ-6-イル)-2-クロロエタン-1-オン(中間体1-2)の合成

反応物1-1(500mg、3.31mmol)を1,2-ジクロロエタン(3mL)に溶解し、反応液を0℃に降温し、その中に三塩化ホウ素(1M、2.65mL)及び三塩化アルミニウム(573.36mg、4.30mmol)を加え、窒素保護下で0℃で反応液にクロロアセトニトリル(299.67mg、3.97mmol)を加え、反応液を窒素保護下で90℃で16h撹拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、氷水(30mL)及び1NのHCl(10mL)を順次に加え、次いで30min撹拌した。反応液にジクロロメタン(30mL×3)を加えて3回抽出し、有機相を合わせて飽和食塩水(30mL)で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取薄層クロマトグラフィー(シリカ、石油エーテル：酢酸エチル=9:1)に付して、表題化合物(210mg)を得た。

10

MS m/z (ESI): 228.0 [M+H]⁺。

【0148】

ステップ2：(S)-15-(クロロメチル)-8-エチル-8-ヒドロキシ-2,3,11,14-テトラヒドロ-12H-[1,4]ジオキシノ[2,3-*g*]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-*b*]キノリン-9,12(8H)-ジオン(中間体1-4)の合成

中間体1-2(100mg、439.28μmol)及び中間体1-3(115.64mg、439.28μmol)を無水トルエン(3mL)に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム(22.08mg、87.86μmol)を加え、反応液を窒素保護下で100℃で16h撹拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール(5mL×2)で洗浄し、表題化合物の粗生成物(130mg)を得た。

20

MS m/z (ESI): 455.1 [M+H]⁺。

【0149】

ステップ3：(S)-15-(アジドメチル)-8-エチル-8-ヒドロキシ-2,3,11,14-テトラヒドロ-12H-[1,4]ジオキシノ[2,3-*g*]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-*b*]キノリン-9,12(8H)-ジオン(中間体1-5)の合成

30

中間体1-4(120mg、263.82μmol)をジメチルスルホキシド(1mL)に溶解し、その中にアジ化ナトリウム(25.73mg、395.73μmol)を加え、反応液を窒素保護下で25℃で3h撹拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。その中に氷水(2mL)を加えて0.5h撹拌し、濾過して表題化合物の粗生成物(90mg)を得た。

MS m/z (ESI): 462.1 [M+H]⁺。

【0150】

ステップ4：(S)-15-(アミノメチル)-8-エチル-8-ヒドロキシ-2,3,11,14-テトラヒドロ-12H-[1,4]ジオキシノ[2,3-*g*]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-*b*]キノリン-9,12(8H)-ジオン(中間体1-6)の合成

40

中間体1-5(90mg、195.05μmol)を無水トルエン(1mL)に溶解し、その中に亜リン酸トリエチル(81.02mg、487.62μmol)を加え、反応液を窒素保護下で100℃で3h撹拌した。反応液を25℃に降温し、その中に塩酸メタノール溶液(0.5mL)を加え、反応液を窒素保護下で85℃で16h撹拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、濾過して表題化合物(18mg)を得た。

MS m/z (ESI): 436.1 [M+H]⁺。

【0151】

50

ステップ5：(S)-N-((8-エチル-8-ヒドロキシ-9,12-ジオキソ-2,3,8,9,12,14-ヘキサヒドロ-11H-[1,4]ジオキシノ[2,3-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物1)の合成

中間体1-6(18mg、41.34 μ mol)及び2-ヒドロキシ酢酸(15.72mg、206.69 μ mol)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(1mL)に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)(23.58mg、62.01 μ mol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(16.03mg、124.02 μ mol)を加え、反応液を25℃で3h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μ mシリカ、直径25mm、長さ100mm、水(0.05%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は10%~30%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(7mg)を得た。

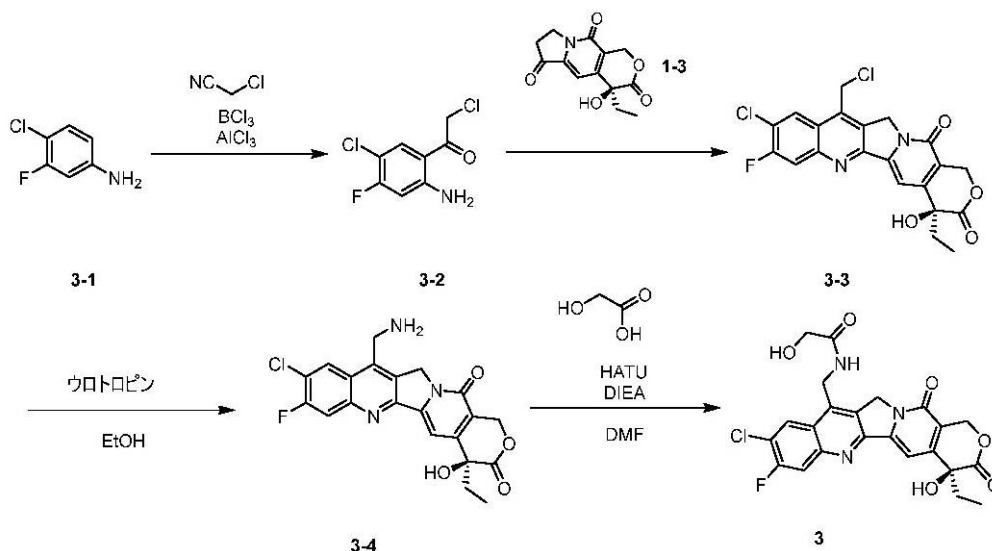
MS m/z (ESI): 494.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.69 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.57 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.74 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.44 (s, 4H), 3.82 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 1.94-1.80 (m, 2H), 0.88 (m, 3H)。

【0152】

実施例3、(S)-N-((9-クロロ-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物3)

【化27】



ステップ1：1-(2-アミノ-5-クロロ-4-フルオロフェニル)-2-クロロエタン-1-オン(中間体3-2)の合成

三塩化ホウ素(1M、13.74mL)を1,2-ジクロロエタン(24mL)に溶解し、反応液を0℃に降温し、その中に反応物3-1(2g、13.74mmol)及びクロロアセトニトリル(1.56g、20.61mmol)を加え、反応液を0℃で10min攪拌し、その中に三塩化アルミニウム(2.38g、17.86mmol)を加えた。

その後、反応液を窒素保護下で25℃に昇温して10min攪拌した。反応液を窒素保護下で90℃で18h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、氷水(50mL)及び5%のHCl(10mL)を順次にゆっくりと加えて25℃で30min攪拌し、ジクロロメタン(50mL)を更に加え、有機相を水(2mL×2)で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5µmシリカ、直径25mm、長さ100mm、水(0.05%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は40%~60%であり、溶離時間は10分である)、表題化合物(320mg)を得た。

10

MS m/z (ESI): 222.0 [M+H]⁺。

【0153】

ステップ2: (S)-9-クロロ-11-(クロロメチル)-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン(中間体3-3)の合成

中間体3-2(220mg、990.80µmol)及び中間体1-3(273.86mg、1.04mmol)をトルエン(2mL)に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム(24.90mg、99.08µmol)を加えた。反応液を100℃で18h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、エタノール(1mL)を加え、反応液を25℃で0.5h攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール(2mL×2)で洗浄し、表題化合物の粗生成物(270mg)を得た。

20

MS m/z (ESI): 449.0 [M+H]⁺。

【0154】

ステップ3: (S)-11-(アミノメチル)-9-クロロ-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン(3-4)の合成

中間体3-3(50mg、111.29µmol)をエタノール(1mL)に溶解し、その中にウロトロピン(23.40mg、166.94µmol)を加えた。反応液を90℃で1.5h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5µmシリカ、直径25mm、長さ100mm、水(0.225%のギ酸を含む)とメタノールの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、メタノールの勾配比は0%~30%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(22mg)を得た。

30

MS m/z (ESI): 430.1 [M+H]⁺。

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ=8.71(d, J=8.0 Hz, 1H), 8.23(d, J=10.3 Hz, 1H), 8.14(s, 0.3H, HCOOH), 7.36(s, 1H), 6.57(s, 1H), 5.52(s, 2H), 5.46(s, 2H), 4.55(s, 2H), 1.93-1.84(m, 2H), 0.90-0.85(m, 3H)。

40

【0155】

ステップ4: (S)-N-((9-クロロ-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物3)の合成

3-4(22mg、51.18µmol)及び2-ヒドロキシ酢酸(19.46mg、255.92µmol)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(1mL)に溶解し、その中にHATU(29.19mg、76.77µmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(19.84mg、153.55µmol)を加え、反応液を25℃で1.5h攪

50

拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（YMC-Actus Triart C18カラム 5 μ mシリカ、直径25mm、長さ100mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は10%～40%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（2.20mg）を得た。

MS m/z (ESI): 488.1 [M+H]⁺。

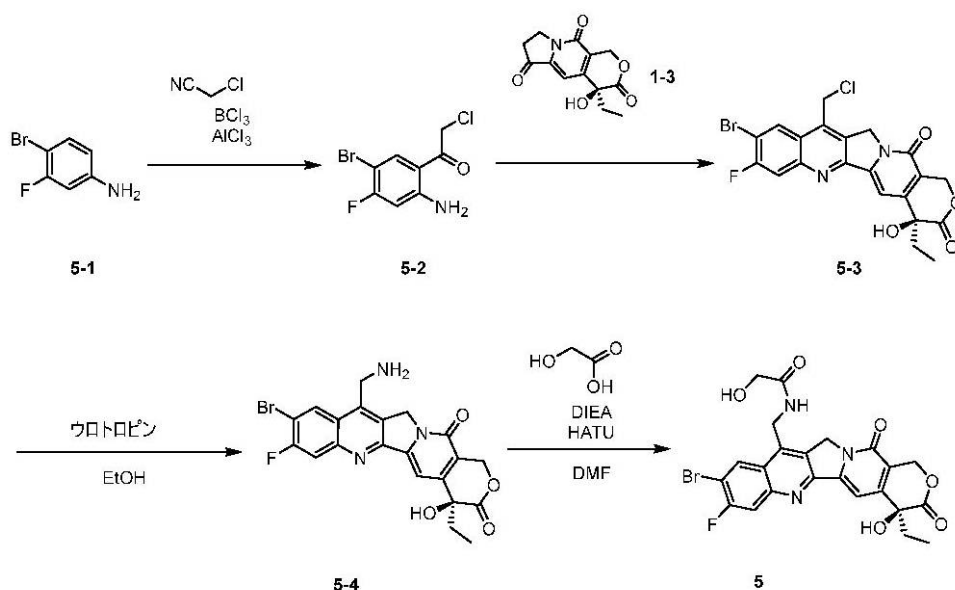
¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.90–8.85 (m, 2H), 8.20 (d, J=10.3 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.60 (t, J=5.7 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.83 (d, J=6.0 Hz, 2H), 3.83 (d, J=5.8 Hz, 2H), 1.93–1.81 (m, 2H), 0.88 (m, 3H)。

10

【0156】

実施例5、(S)-N-((9-ブロモ-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物5）

【化28】



20

30

ステップ1：1-(2-アミノ-5-ブロモ-4-フルオロフェニル)-2-クロロエタン-1-オン（中間体5-2）の合成

三塩化ホウ素（1M、10.53mL）を1,2-ジクロロエタン（24mL）に溶解し、反応液を0℃に降温し、その中に中間体5-1（2g、10.53mmol）及びクロロアセトニトリル（1.19g、15.79mmol）を加え、反応液を0℃で10min 40 攪拌し、その中に三塩化アルミニウム（1.82g、13.68mmol）を加えた。反応液を窒素保護下で25℃で10min 攪拌した。次いで90℃に昇温して18h 攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、氷水（50mL）及び5%のHCl（10mL）を順次にゆっくりと加えて25℃で30min 攪拌し、ジクロロメタン（50mL）を更に加え、有機相を水（2mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（YMC-Actus Triart C18カラム 5 μ mシリカ、直径25mm、長さ100mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は39%～49%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（380mg）得た。 50

MS m/z (ESI) : 265.9 [M+H]⁺.

【0157】

ステップ2: (S)-9-ブromo-11-(クロロメチル)-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン(中間体5-3)の合成

中間体5-2(200mg、750.48 μmol)及び中間体1-3(207.44mg、788.01 μmol)を無水トルエン(4mL)に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム(22.63mg、90.06 μmol)を加えた。反応液を100℃で18h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、エタノール(1mL)を加え、反応液を25℃で0.5h攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール(2mL×2)で洗浄し、表題化合物の粗生成物(200mg)を得た。

10

MS m/z (ESI) : 493.0 [M+H]⁺.

【0158】

ステップ3: (S)-11-(アミノメチル)-9-ブromo-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン(中間体5-4)の合成

中間体5-3(200mg、405.10 μmol)をエタノール(4mL)に溶解し、その中にウロトロピン(113.58mg、810.19 μmol)を加えた。反応液を90℃で1.5h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm 、直径25mm、長さ100mm、水(0.225%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は6%~26%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(30mg)を得た。

20

MS m/z (ESI) : 476.0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.83 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 8.14 (s, 0.4H, HCOOH), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 1.92-1.85 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

30

【0159】

ステップ4: (S)-N-((9-ブromo-4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物5)の合成

中間体5-4(15mg、26.88 μmol)及び2-ヒドロキシ酢酸(10.22mg、134.41 μmol)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(1mL)に溶解し、その中にHATU(15.33mg、40.32 μmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(10.42mg、80.65 μmol)を加え、反応液を25℃で1h攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm 、直径25mm、長さ100mm、水(0.05%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は6%~36%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(2.09mg)を得た。

40

MS m/z (ESI) : 532.0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 9.00 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.86 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.60 (t, J = 5.7 Hz,

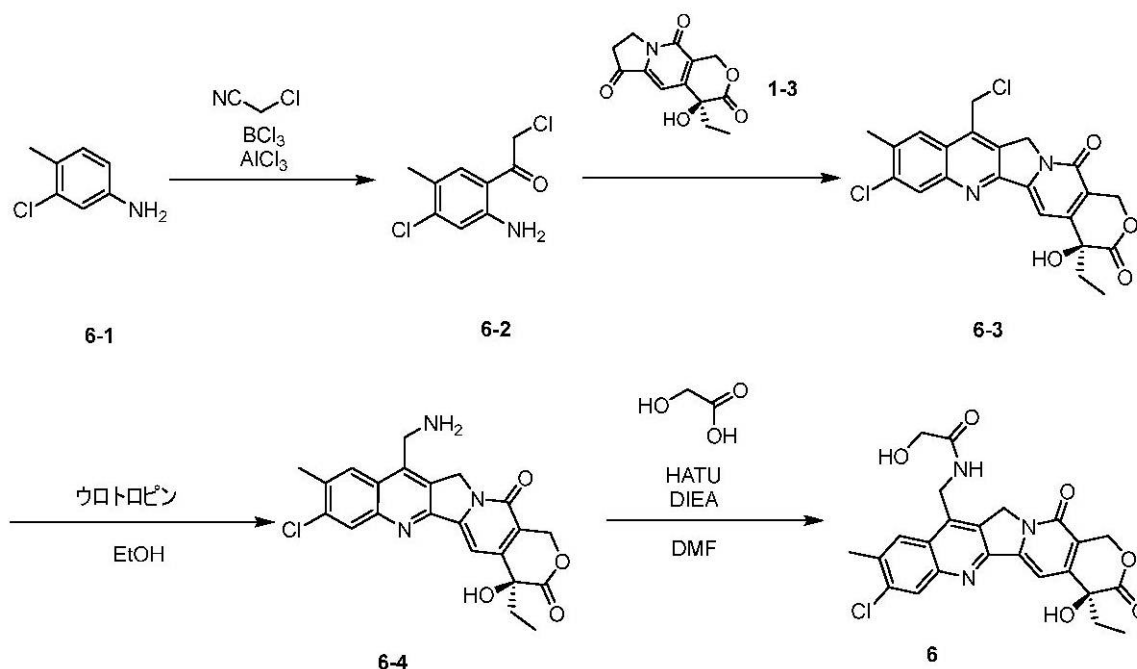
50

z , 1 H), 5.56 (s, 2 H), 5.45 (s, 2 H), 4.83 (d, $J=5.8$ Hz, 2 H), 3.83 (d, $J=5.9$ Hz, 2 H), 1.94–1.82 (m, 2 H), 0.88 (t, $J=7.4$ Hz, 3 H)。

【0160】

実施例 6、(S)-N-(8-クロロ-4-エチル-4-ヒドロキシ-9-メチル-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 6)

【化29】



ステップ 1：1-(2-アミノ-4-クロロ-5-メチルフェニル)-2-クロロエタン-1-オン (中間体 6-2) の合成

三塩化ホウ素 (1 M、2.82 mL) を 1,2-ジクロロエタン (8 mL) に溶解し、反応液を 0℃ に降温し、その中に反応物 6-1 (0.5 g、3.53 mmol) 及びクロロアセトニトリル (319.91 g、4.24 mmol) を加え、反応液を 0℃ で 10 min 攪拌し、その中に三塩化アルミニウム (612.09 mg、4.59 mmol) を加えた。反応液を窒素保護下で 25℃ で 10 min 攪拌した。その後、反応液を 90℃ に昇温し 18 h 攪拌した。LC-MS で反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、氷水 (25 mL) 及び 5% の HCl (5 mL) を順次にゆっくりと加えて 25℃ で 30 min 攪拌し、ジクロロメタン (20 mL) を更に加え、有機相を水 (20 mL × 2) で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。分取薄層クロマトグラフィー (シリカ、石油エーテル：酢酸エチル = 9：1) により、表題化合物 (500 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 218.0 [M+H]⁺

【0161】

ステップ 2：(S)-8-クロロ-11-(クロロメチル)-4-エチル-4-ヒドロキシ-9-メチル-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン (中間体 6-3) の合成

中間体 6-2 (250 mg、1.15 mmol) 及び中間体 1-3 (316.87 mg、1.20 mmol) をトルエン (5 mL) に溶解し、その中に p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (34.57 mg、137.56 μ mol) を加えた。反応液を 100℃ で 18 h 攪拌した。LC-MS で反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後

、エタノール（１ｍＬ）を加え、反応液を２５℃で０．５ｈ攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール（２ｍＬ×２）で洗浄し、表題化合物の粗生成物（２３０ｍｇ）を得た。

MS m/z (ESI) : 445.1 [M+H]⁺.

【０１６２】

ステップ３：（Ｓ）－１１－（アミノメチル）－８－クロロ－４－エチル－４－ヒドロキシ－９－メチル－１，１２－１４Ｈ－ピラノ〔３′，４′：６，７〕インドリジノ〔１，２－ｂ〕キノリン－３，１４（４Ｈ）－ジオン（中間体６－４）の合成

中間体６－３（４９．５６ｍｇ、１１１．２９μｍｏｌ）をエタノール（０．５ｍＬ）に溶解し、その中にウロトロピン（２３．４０ｍｇ、１６６．９４μｍｏｌ）を加えた。反応液を９０℃で１．５ｈ攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（YMC-Actus Triart C18カラム 5μm、直径25mm、長さ100mm、水（０．２２５％のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は２％～３２％であり、溶離時間は１２分である）、表題化合物（１１．０ｍｇ）を得た。

MS m/z (ESI) : 426.2 [M+H]⁺.

【０１６３】

ステップ４：（Ｓ）－Ｎ－（（８－クロロ－４－エチル－４－ヒドロキシ－９－メチル－３，１４－ジオキソ－３，４，１２，１４－テトラヒドロ－１Ｈ－ピラノ〔３′，４′：６，７〕インドリジノ〔１，２－ｂ〕キノリン－１１－イル）メチル）－２－ヒドロキシアセトアミド（化合物６）の合成

中間体６－４（１１ｍｇ、２５．８３μｍｏｌ）及び２－ヒドロキシ酢酸（９．８２ｍｇ、１２９．１５μｍｏｌ）を無水N，N－ジメチルホルムアミド（０．５ｍＬ）に溶解し、その中にHATU（１４．７３ｍｇ、３８．７４μｍｏｌ）及びN，N－ジイソプロピルエチルアミン（１０．０１ｍｇ、７７．４９μｍｏｌ）を加え、反応液を２５℃で１ｈ攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（YMC-Actus Triart C18カラム 5μm、直径25mm、長さ100mm、水（０．０５％のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は１０％～４０％であり、溶離時間は１２分である）、表題化合物（３．００ｍｇ）を得た。

MS m/z (ESI) : 484.1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.77 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.59 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.85 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.84 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.91–1.82 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)

【０１６４】

実施例７、（Ｓ）－Ｎ－（（８－エチル－８－ヒドロキシ－９，１２－ジオキソ－２，３，８，９，１２，１４－ヘキサヒドロ－１Ｈ，１１Ｈ－シクロペンタ〔f〕ピラノ〔３′，４′：６，７〕インドリジノ〔１，２－ｂ〕キノリン－１５－イル）メチル）－２－ヒドロキシアセトアミド（化合物７）

10

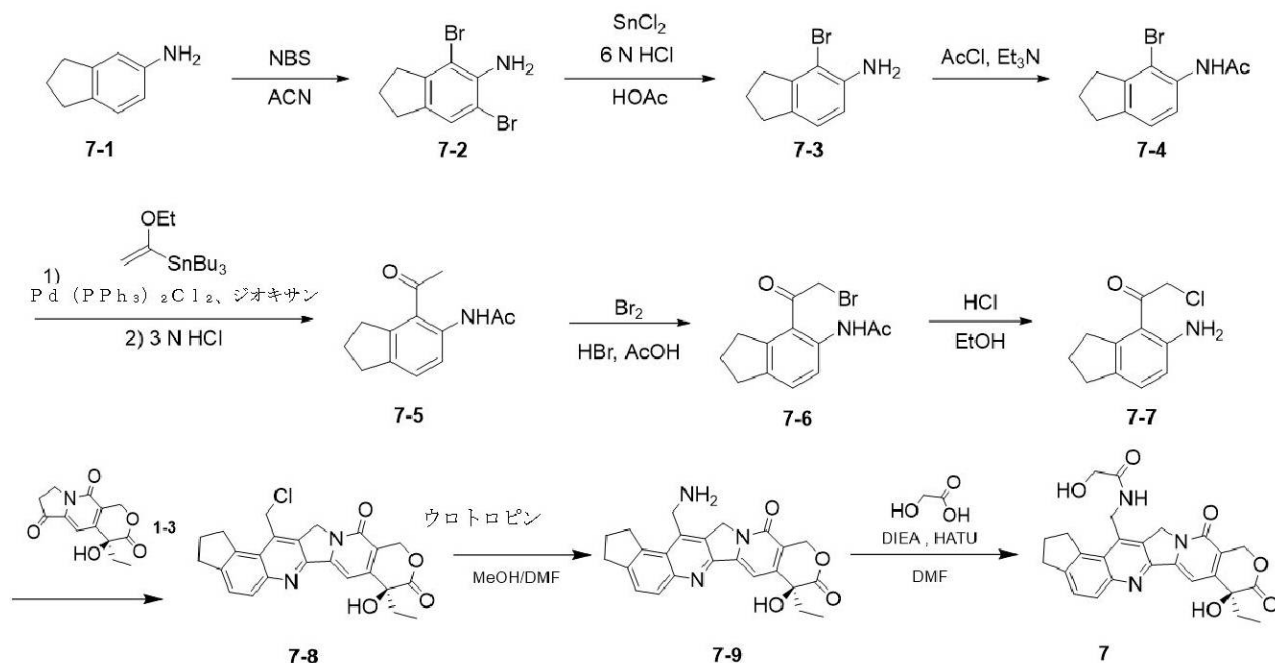
20

30

40

50

【化 3 0】



10

20

ステップ 1 : 4, 6-ジブromo-2, 3-ジヒドロ-1H-インデン-5-アミン (中間体 7-2) の合成

中間体 7-1 (10.0 g) を無水アセトニトリルに溶解し、0℃でN-ブロモスクシンイミド (NBS) (27.5 g) を数回に分けて加え、その後室温で一晩攪拌した。反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮し、残留物を200 mLの酢酸エチルに溶解し、水 (100 mL × 2) で洗浄した。得られた有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、シリカゲルでサンプルと混合した後、珪藻土に置き、500 mLの石油エーテルで濯ぎ、濾液を濃縮して表題化合物 (17.0 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 289.9 [M+H]⁺。

30

【0165】

ステップ 2 : 4-ブromo-2, 3-ジヒドロ-1H-インデン-5-アミン (中間体 7-3) の合成

中間体 7-2 (15.0 g) 及び塩化第一スズ (15.0 g) を酢酸 75 mL に溶解し、6 N の濃塩酸 140 mL を加え、90℃で3 h 反応させた。反応系を室温に冷却し、濃縮して酢酸を除去し、残留物を酢酸エチル 100 mL に溶解し、飽和炭酸ナトリウム水溶液で pH を 8 程度に調整し、濾過し、濾液から有機相を分離し、水相を更に酢酸エチル (50 mL × 3) で抽出した。有機相を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下で濃縮し、表題化合物 (10 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 212.0 [M+H]⁺。

40

【0166】

ステップ 3 : N-(4-ブromo-2, 3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル) アセトアミド (中間体 7-4) の合成

中間体 7-3 (10.0 g) を無水ジクロロメタン 100 mL に溶解し、トリエチルアミン (10.6 g) を加え、0℃で塩化アセチル (5.5 g) をゆっくりと滴下した後、反応系を室温で一晩攪拌した。反応液を水 (100 mL × 2) で洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (石油エーテル : 酢酸エチル = 90 : 10)、表題化合物 (7.1 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 254.0 [M+H]⁺。

50

【0167】

ステップ4：N-（4-アセチル-2，3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル）アセトアミド（中間体7-5）の合成

窒素保護下、中間体7-4（6.7 g）及びトリブチル-（2-エトキシビニル）スズ（10.4 g）を無水1，4-ジオキサン100 mLに溶解し、次いで二塩化ビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（1.8 g）を加えた後、反応系を100℃で一晩撹拌した。反応液を室温に冷却し、3 Nの塩酸30 mLを加え、室温で1 h撹拌した。反応液を珪藻土で濾過し、得られた濾液を酢酸エチル100 mLで希釈し、水（100 mL×2）で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下で濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝85：15）、表題化合物（4.7 g）を得た。

10

MS m/z（ESI）：218.1 [M+H]⁺。

【0168】

ステップ5：N-（4-（2-ブロモアセチル）-2，3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル）アセトアミド（中間体7-6）の合成

中間体7-5（4.7 g）を酢酸50 mLに溶解し、33%の臭化水素酸-酢酸溶液7.3 gを加え、室温でゆっくりと臭素（2.85 g）を滴下し、その後室温で3 h撹拌しながら反応させ続けた。反応終了後、反応液を氷水に注ぎ、大量の固体が析出するまで撹拌し、濾過し、濾過ケーキを石油エーテルで洗浄し、得られた固体を乾燥させて表題化合物（5.0 g）を得た。

20

MS m/z（ESI）：296.0 [M+H]⁺。

【0169】

ステップ6：1-（5-アミノ-2，3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）-2-クロロエタン-1-オン（中間体7-7）の合成

中間体7-6（5.0 g）をエタノール30 mLに溶解し、6 Nの濃塩酸35 mLを加え、反応系を80℃で2 h撹拌した。反応系を室温に冷却し、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をジクロロメタン100 mLで溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でpHを7程度に調整し、有機相を分離し、水相を更にジクロロメタン（50 mL×2）で抽出した。有機相を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下で濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝75：25）、表題化合物（840 mg）を得た。

30

MS m/z（ESI）：210.0 [M+H]⁺。

【0170】

ステップ7：（S）-15-（クロロメチル）-8-エチル-8-ヒドロキシー-1，2，3，8，11，14-ヘキサヒドロ-9H，12H-シクロペンタ[f]ピラノ[3'，4'：6，7]インドリジノ[1，2-b]キノリン-9，12-ジオン（中間体7-8）の合成

中間体7-7（100 mg）及び中間体1-3（125.55 mg）をトルエン（5 mL）に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム（5.99 mg）を加えた。反応液を90℃で18 h撹拌した。反応液を室温に冷却した後、エタノール（1 mL）を加え、反応液を25℃で0.5 h撹拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキを石油エーテル（2 mL×2）で洗浄し、表題化合物（180 mg）を得た。

40

MS m/z（ESI）：437.0 [M+H]⁺。

【0171】

ステップ8：（S）-15-（アミノメチル）-8-エチル-8-ヒドロキシー-1，2，3，8，11，14-ヘキサヒドロ-9H，12H-シクロペンタ[f]ピラノ[3'，4'：6，7]インドリジノ[1，2-b]キノリン-9，12-ジオン（中間体7-9）の合成

中間体7-8（50 mg）をメタノール（1 mL）とN，N-ジメチルホルムアミド（1 mL）の混合溶液に溶解し、その中にウロトロピン（483.13 mg）を加えた。反応液を50℃で4 h撹拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却し、濃塩酸（0.5 mL）

50

を加えて 0.5 h 攪拌し、次いで減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μ m、直径 2.5 mm、長さ 100 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 20% ~ 40% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (22.0 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 418.2 [M+H]⁺。

【0172】

ステップ 9: (S)-N-((8-エチル-8-ヒドロキシ-9,12-ジオキソ-2,3,8,9,12,14-ヘキサヒドロ-1H,11H-シクロペンタ[f]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 7) の合成

中間体 7-9 (15 mg) 及びヒドロキシ酢酸 (10.93 mg) を無水 N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (27.32 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (4.64 mg) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μ m、直径 2.5 mm、長さ 100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 30% ~ 50% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (9.0 mg) を得た。

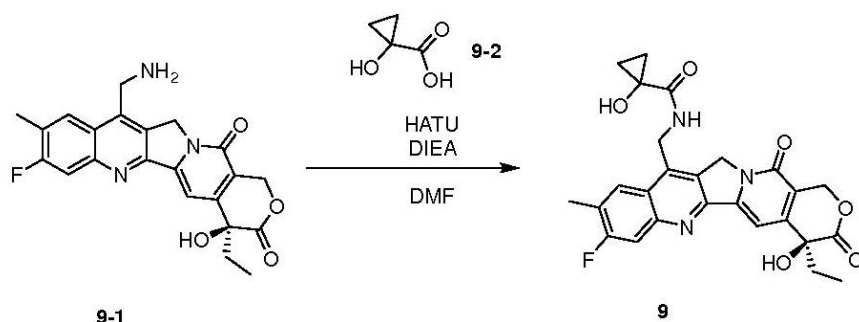
MS m/z (ESI): 476.2 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.28 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.49-5.45 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.97 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.88 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.57 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.09 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.23-2.15 (m, 2H), 1.95-1.80 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

【0173】

実施例 9、(S)-N-((4-エチル-8-フルオロ-4-ヒドロキシ-9-メチル-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3'',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-1-ヒドロキシシクロプロパン-1-カルボキサミド (化合物 9)

【化 31】



中間体 9-1 (6.00 mg、14.66 μ mol、特許文献 WO 2020 219 287 に報告された方法に従って合成できる) 及び中間体 9-2 (4.49 mg、43.97 μ mol) を無水 N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (8.36 mg、21.98 μ mol) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (5.68 mg、43.97 μ mol) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。LC-MS で反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (YMC-Actus Triart C18 カラム 5 μ m シリカ、直径 2

5 mm、長さ100 mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は6%～36%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（3.00 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 494.2 $[M+H]^+$ 。

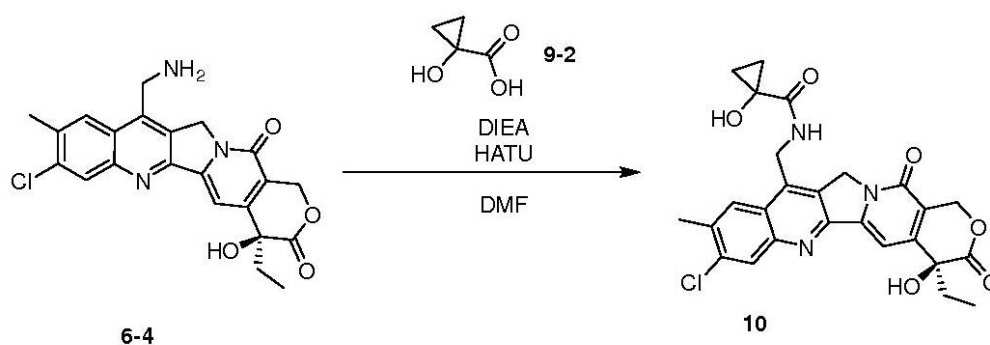
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.96 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.85 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H), 1.92–1.83 (m, 2H), 1.05–1.00 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.85–0.81 (m, 2H)。

10

【0174】

実施例10、(S)-N-((8-クロロ-4-エチル-4-ヒドロキシ-9-メチル-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-1-ヒドロキシシクロプロパン-1-カルボキサミド（化合物10）

【化32】



20

中間体6-4（6.24 mg、14.66 μmol ）及び中間体9-2（4.49 mg、43.97 μmol ）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、その中にHATU（8.36 mg、21.98 μmol ）及びDIEA（5.68 mg、43.97 μmol ）を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、減圧下で濃縮乾固した。粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm シリカ、直径25 mm、長さ100 mm、水（0.225%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は16%～46%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（2.20 mg）を得た。

30

MS m/z (ESI): 510.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.96 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.84 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.59 (s, 3H), 1.94–1.80 (m, 2H), 1.01 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 3.0 Hz, 2H)。

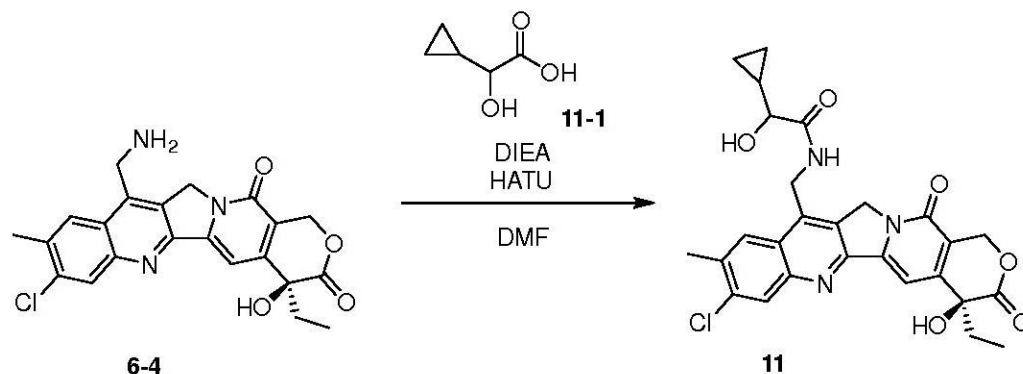
40

【0175】

実施例11、N-((S)-8-クロロ-4-エチル-4-ヒドロキシ-9-メチル-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物11）

50

【化 3 3】



10

中間体 6-4 (6.0 mg、14.09 μmol) 及び中間体 11-1 (8.18 mg、70.45 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (8.04 mg、21.13 μmol) 及び DIEA (5.46 mg、42.27 μmol) を加え、反応液を 25°C で 1 h 攪拌した。LC-MS で反応が完了したことを検出した。反応液を濾過し、減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (YMC-Actus Triart C18 カラム 5 μm 、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 16% ~ 46% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (3.0 mg) を得た。

20

MS m/z (ESI): 524.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.66 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.53 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.91-4.76 (m, 2H), 3.61-3.55 (m, 1H), 2.59 (s, 3H), 1.94-1.82 (m, 2H), 1.05-0.97 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.34-0.31 (m, 2H), 0.29-0.20 (m, 2H)。

30

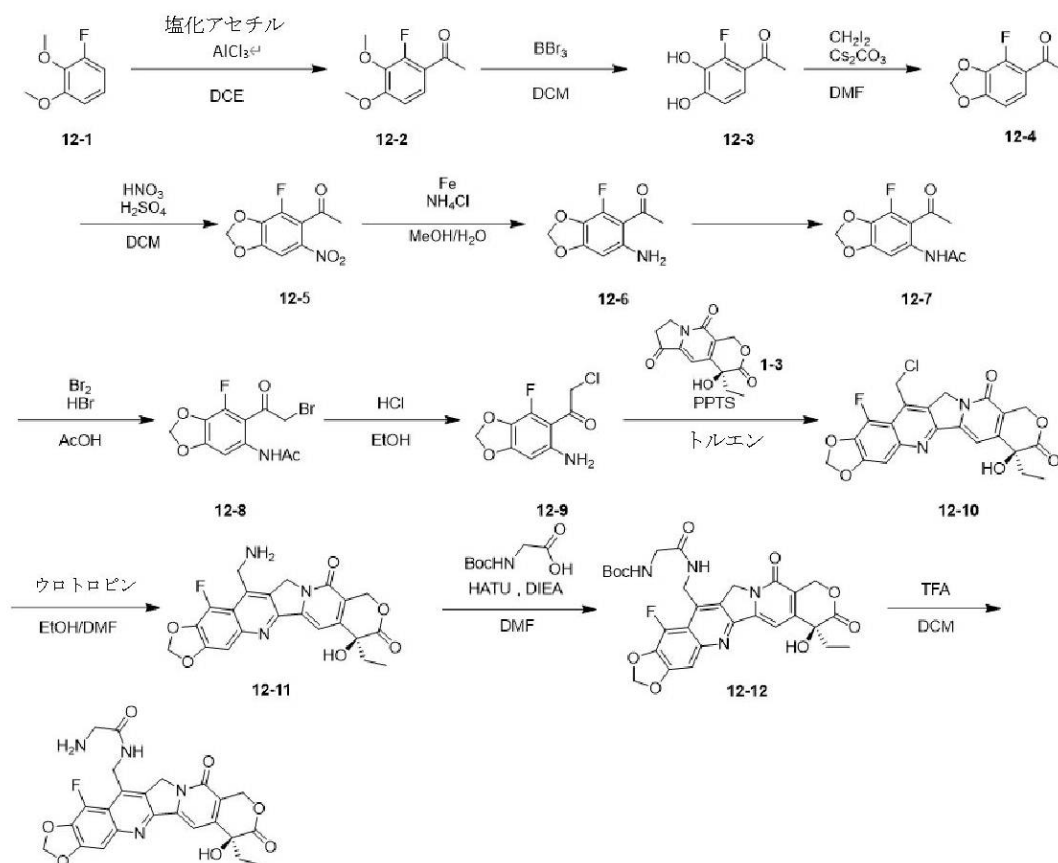
【0176】

実施例 12、(S)-2-アミノ-N-((7-エチル-15-フルオロ-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)アセトアミド (化合物 12)

40

50

【化 3 4】



10

20

ステップ 1：1-（2-フルオロ-3，4-ジメトキシフェニル）エタン-1-オン（中間体 12-2）の合成

中間体 12-1（25.0 g）を 1，2-ジクロロエタン（DCE、250 mL）に溶解し、反応液を 0℃に冷却し、その中に三塩化アルミニウム（64.04 g）をゆっくりと加え、反応液に塩化アセチル（64.04 g）を更に滴下した。反応液を窒素雰囲気下で 0℃で 2 h 撹拌した。反応終了後、その中に水（300 mL）を加え、酢酸エチル（150 mL × 3 回）で抽出し、有機相を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、有機相を減圧下で濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（ISCO(R)、120 g SepaFlash(R) フラッシュシリカゲルカラム、勾配 0～50% 石油エーテル／酢酸エチル、流速 70 mL/min）、表題化合物（21.0 g）を得た。

MS m/z (ESI)：199.0 [M+H]⁺。

【0177】

ステップ 2：1-（2-フルオロ-3，4-ジヒドロキシフェニル）エタン-1-オン（中間体 12-3）の合成

中間体 12-2（15.00 g）を無水ジクロロメタン（DCM、150 mL）に溶解し、反応液を -78℃に冷却し、その中に三臭化ホウ素（56.88 g）をゆっくりと滴下し、反応液を窒素雰囲気下で -78℃で 2 h 撹拌し、更に 0℃に昇温して 4 h 反応させた。反応終了後、反応液を氷水にゆっくりと滴下してクエンチし、クエンチ終了後、酢酸エチル（150 mL × 3 回）で抽出し、有機相を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、有機相を減圧下で濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（ISCO(R)、120 g SepaFlash(R) フラッシュシリカゲルカラム、勾配 0～50% 石油エーテル／酢酸エチル、流速 70 mL/min）、表題化合

30

40

50

物 (8.50 g) を得た。

MS m/z (ESI): 171.0 [M+H]⁺。

【0178】

ステップ3: 1-(4-フルオロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エタン-1-オン(中間体12-4)の合成

中間体12-3 (4.0 g) を無水N, N-ジメチルホルムアミド (40 mL) に溶解し、その中に炭酸セシウム (11.49 g) 及び1, 2-ジヨードメタン (18.89 g) を加えた。反応液を窒素雰囲気下で100℃で8min攪拌した。反応終了後、反応液を水にゆっくりと注ぎ、酢酸エチル (50 mL × 3回) で抽出し、有機相を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、有機相を減圧下で濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (ISCO(R)、24 g SepaFlash(R) フラッシュシリカゲルカラム、勾配0~15% 石油エーテル/酢酸エチル、流速60 mL/min)、表題化合物 (2.0 g) を得た。

MS m/z (ESI): 183.0 [M+H]⁺。

【0179】

ステップ4: 1-(4-フルオロ-6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エタン-1-オン(中間体12-5)の合成

中間体12-4 (2.0 g) を無水ジクロロメタン (15 mL) に溶解し、その中に濃硫酸 (5.38 g、質量分率98%) を加え、反応液を0℃に降温した。更に反応液に濃硝酸 (3.46 g、質量分率68%) をゆっくりと滴下した。反応液を25℃で2h攪拌した。反応終了後、反応液を氷水 (50 mL) にゆっくりと滴下し、酢酸エチル (50 mL) を更に加え、有機相を水 (50 mL × 2) で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (ISCO(R)、24 g SepaFlash(R) フラッシュシリカゲルカラム、勾配0~40% 石油エーテル/酢酸エチル、流速60 mL/min)、表題化合物 (1.8 g) を得た。

¹H NMR (400 MHz、重クロロホルム) δ = 7.51 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 2.63 (s, 3H)。

【0180】

ステップ5: 1-(6-アミノ-4-フルオロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エタン-1-オン(中間体12-6)の合成

中間体12-5 (1.8 g) を無水メタノール (18 mL) 及び水 (9 mL) に溶解し、その中に塩化アンモニウム (635.83 mg) 及び鉄粉 (2.21 mg) を加えた。反応液を窒素雰囲気下で80℃で2h攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した。反応液を濾過し、濾液を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、有機相を水 (50 mL × 2) で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮乾固し、表題化合物 (1.5 g) を得た。

MS m/z (ESI): 198.0 [M+H]⁺。

【0181】

ステップ6: N-(6-アセチル-7-フルオロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)アセトアミド(中間体12-7)の合成

中間体12-6 (500.0 mg) を無水ジクロロメタン (5 mL) に溶解し、その中にピリジン (601.79 mg) を加え、窒素雰囲気下で反応に塩化アセチル (398.14 mg) を滴下した。反応液を窒素雰囲気下で25℃で1.5h攪拌した。反応終了後、有機相を減圧下で濃縮乾固した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (ISCO(R)、12 g SepaFlash(R) フラッシュシリカゲルカラム、勾配0~40% 石油エーテル/酢酸エチル、流速60 mL/min)、表題化合物 (380.0 g) を得た。

¹H NMR (400 MHz、重クロロホルム) δ = 11.72 (s, 1H), 8.18 (d, J=1.0 Hz, 1H), 6.10 (s, 2H), 2.64 (d, J=8.4

10

20

30

40

50

H z , 3 H) , 2 . 2 2 (s , 3 H) 。

【 0 1 8 2 】

ステップ 7 : N - (6 - (2 - ブロモアセチル) - 7 - フルオロベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) アセトアミド (中間体 1 2 - 8) の合成

中間体 1 2 - 7 (3 8 0 . 0 m g) を酢酸 (3 m L) に溶解し、その中に臭化水素の酢酸溶液 (1 . 9 5 g 、含有量 3 3 %) を加え、更に反応液に液体臭素 (2 5 6 . 4 2 m g) をゆっくりと滴下した。反応液を 2 5 ° C で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液をゆっくりと氷水に注ぎ、0 . 5 h 攪拌し、濾過し、濾過ケーキを水 (2 0 m L × 2) で洗浄し、濾過ケーキを乾燥させて表題化合物 (4 0 0 . 0 m g) を得た。

M S m / z (E S I) : 3 1 7 . 8 [M + H] ⁺。

10

【 0 1 8 3 】

ステップ 8 : 1 - (6 - アミノ - 4 - フルオロベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) - 2 - クロロエタン - 1 - オン (中間体 1 2 - 9) の合成

中間体 1 2 - 8 (4 0 0 . 0 m g) を無水エタノール (2 m L) 及び濃塩酸 (2 m L) に溶解し、反応液を 6 0 ° C で 3 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、氷水 (2 0 m L) を順次にゆっくりと加え、飽和炭酸水素ナトリウムで p H = 8 に調整し、酢酸エチル (4 0 m L) を更に加え、有機相を水 (2 0 m L × 2) で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮乾固し、表題化合物 (2 2 0 . 0 m g) を得た。

M S m / z (E S I) : 2 3 2 . 0 [M + H] ⁺。

20

【 0 1 8 4 】

ステップ 9 : (S) - 1 4 - (クロロメチル) - 7 - エチル - 1 5 - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 1 0 , 1 3 - ジヒドロ - 1 1 H - [1 , 3] ジオキソロ [4 , 5 - g] ピラノ [3 ' , 4 ' : 6 , 7] インドリジノ [1 , 2 - b] キノリン - 8 , 1 1 (7 H) - ジオン (中間体 1 2 - 1 0) の合成

中間体 1 2 - 9 (2 0 0 . 0 m g) 及び中間体 1 - 3 (2 2 7 . 3 2 m g) をトルエン (3 m L) に溶解し、その中に p - トルエンスルホン酸ピリジニウム (2 1 . 7 0 m g) を加えた。反応液を 9 0 ° C で 1 6 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、エタノール (1 m L) を加え、反応液を 2 5 ° C で 0 . 5 h 攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール (5 m L × 2) で洗浄し、表題化合物 (3 2 0 . 0 m g) を得た。

30

M S m / z (E S I) : 4 5 9 . 0 [M + H] ⁺。

【 0 1 8 5 】

ステップ 1 0 : (S) - 1 4 - (アミノメチル) - 7 - エチル - 1 5 - フルオロ - 7 - ヒドロキシ - 1 0 , 1 3 - ジヒドロ - 1 1 H - [1 , 3] ジオキソロ [4 , 5 - g] ピラノ [3 ' , 4 ' : 6 , 7] インドリジノ [1 , 2 - b] キノリン - 8 , 1 1 (7 H) - ジオン (中間体 1 2 - 1 1) の合成

中間体 1 2 - 1 0 (2 6 0 . 0 0 m g) を無水メタノール (1 m L) 及び無水 N , N - ジメチルホルムアミド (1 m L) に溶解し、その中にウロトロピン (2 3 8 . 3 2 m g) を加えた。反応液を 5 0 ° C で 3 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (B o s t o n P r i m e C 1 8 カラム 5 μ m シリカ、直径 3 0 m m 、長さ 1 5 0 m m 、水 (0 . 2 2 5 % のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する (アセトニトリルの勾配比は 0 % ~ 3 0 % であり、溶離時間は 1 4 分である)) 、表題化合物 (8 5 . 0 m g) を得た。

40

M S m / z (E S I) : 4 4 0 . 0 [M + H] ⁺。

¹ H N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) δ = 7 . 4 9 (s , 1 H) , 7 . 2 6 (s , 1 H) , 6 . 5 3 (s , 1 H) , 6 . 3 8 (s , 2 H) , 5 . 4 4 (s , 4 H) , 4 . 2 7 (s , 2 H) , 1 . 9 4 - 1 . 7 9 (m , 2 H) , 0 . 8 8 (t , J = 7 . 3 H z , 3 H) 。

【 0 1 8 6 】

50

ステップ 11: (S)-2-((7-エチル-15-フルオロ-7-ヒドロキシ-8, 11-ジオキソ-8, 10, 11, 13-テトラヒドロ-10H-[1, 3]ジオキソロ[4, 5-g]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-14-イル)メチル)アミノ)-2-オキソエチル)カルバミン酸tert-ブチル(中間体 12-12)の合成

中間体 12-11 (7 mg) 及び 2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)酢酸 (5.58 mg) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、その中に 2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (12.11 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (2.06 mg) を加え、反応液を 25℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濃縮乾固し、表題化合物 (8.00 mg) を得た。

10

MS m/z (ESI): 597.3 [M+H]⁺。

【0187】

ステップ 12: (S)-2-アミノ-N-((7-エチル-15-フルオロ-7-ヒドロキシ-8, 11-ジオキソ-7, 8, 11, 13-テトラヒドロ-10H-[1, 3]ジオキソロ[4, 5-g]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-14-イル)メチル)アセトアミド(化合物 12)の合成

中間体 12-12 (6 mg) をジクロロメタン (0.5 mL) に溶解し、その中にトリフルオロ酢酸 (902.27 mg) を加え、反応液を 25℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 µm、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する (アセトニトリルの勾配比は 2% ~ 32% であり、溶離時間は 12 分である))、表題化合物 (1.3 mg) を得た。

20

MS m/z (ESI): 497.1 [M+H]⁺。

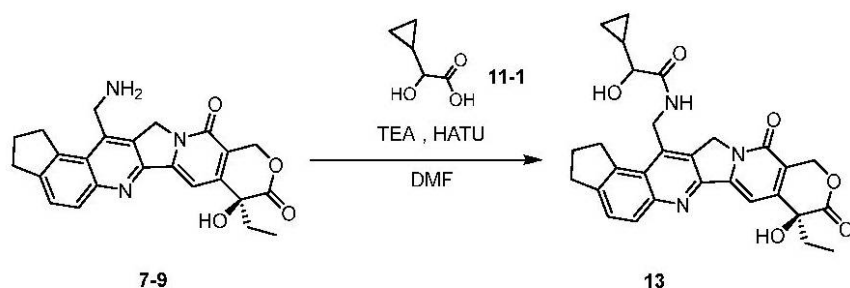
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.80-8.58 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 (s, 2H), 3.09-2.75 (m, 2H), 1.92-1.79 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.1 Hz, 3H)。

30

【0188】

実施例 13、2-シクロプロピル-N-((S)-8-エチル-8-ヒドロキシ-9, 12-ジオキソ-2, 3, 8, 9, 12, 14-ヘキサヒドロ-1H, 11H-シクロペンタ[f]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物 13)

【化 35】



40

中間体 7-9 (10 mg) 及び中間体 11-1 (8.34 mg) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (13.66 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (3.10 mg) を加え、反応液を 25℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラ

50

フィーにより精製し（Waters Xbridge C18カラム 5 μ m、直径25 mm、長さ100 mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は34%～54%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（0.8 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 516.2 $[M+H]^+$ 。

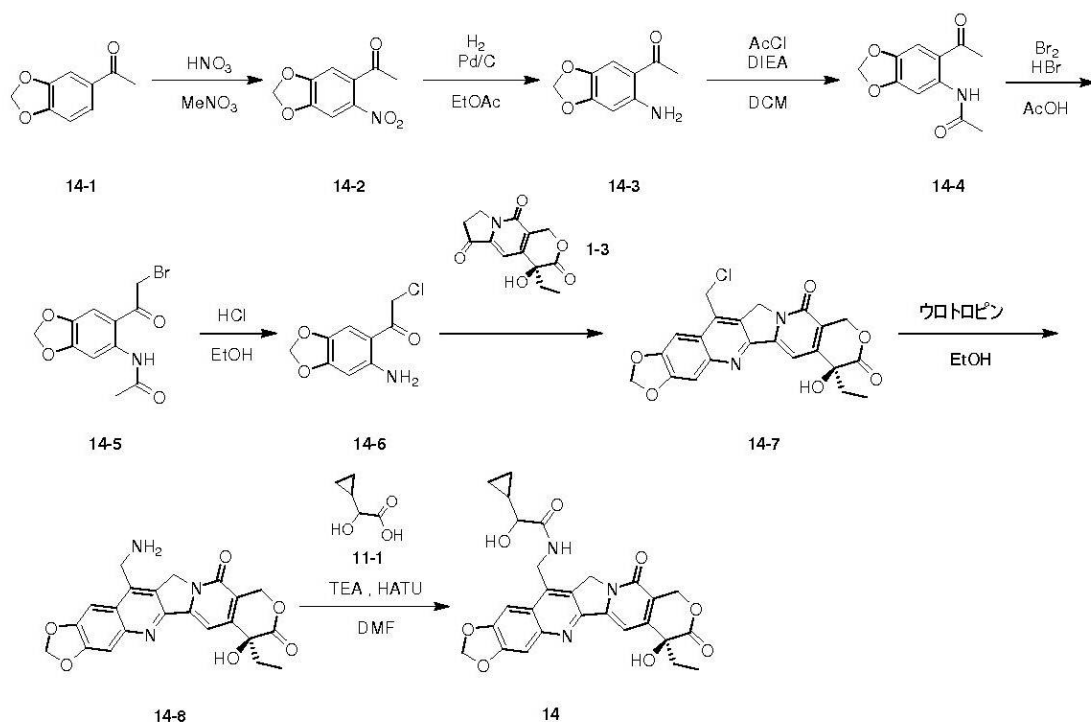
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.25 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.99–4.85 (m, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.56 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.08 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.23–2.16 (m, 2H), 1.92–1.72 (m, 2H), 1.15–1.01 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.46–0.19 (m, 4H)

10

【0189】

実施例14-1、2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物14）

【化36】



20

30

ステップ1：1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エタノン（中間体14-2）の合成

40

中間体14-1（10.0 g、60.92 mmol）をニトロメタン（100 mL）に溶解し、その中に硝酸（35.43 g、365.50 mmol、純度65%）をゆっくりと加え、反応液を25℃で2.5 h 攪拌した。反応終了後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム溶液をゆっくりと加えてpHを7～8に調整し、その中にジクロロメタン（100 mL）を更に加え、有機相を水（50 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。分取薄層クロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝1：2）、表題化合物（5 g）を得た。

MS m/z (ESI): 210.0 $[M+H]^+$ 。

【0190】

ステップ2：1-(6-アミノベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エタノン

50

ン（中間体 14-3）の合成

中間体 14-2（2.37 g、11.33 mmol）を無水エタノール（25 mL）に溶解し、その中にパラジウム炭素（0.2 g、純度 10%）を加え、反応液を水素保護下で 25℃で 16 h 撹拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾過ケーキを酢酸エチルで 2 回洗浄し、濾液を減圧下で濃縮乾固して表題化合物（1.6 g）を得た。

MS m/z (ESI): 180.1 [M+H]⁺。

【0191】

ステップ 3: N-(6-アセチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)アセトアミド（中間体 14-4）の合成

中間体 14-3（1.0 g、5.58 mmol）をジクロロメタン（10 mL）に溶解し、反応液を 0℃に冷却し、その中に N,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）（1.08 g、8.37 mmol）及び塩化アセチル（569.55 mg、7.26 mmol）を加えた。反応液を 25℃で 1.5 h 撹拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固して表題化合物（1.23 g）を得た。

MS m/z (ESI): 222.1 [M+H]⁺。

【0192】

ステップ 4: N-(6-(2-ブロモアセチル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)アセトアミド（中間体 14-5）の合成

中間体 14-4（1.23 g、5.00 mmol）を酢酸（12 mL）に溶解し、その中に臭化水素の酢酸溶液（1.84 g、7.51 mmol、純度 33%）を加え、更にその中に液体臭素（959.69 mg、6.01 mmol）をゆっくりと加え、反応液を 25℃で 1 h 撹拌した。反応終了後、反応液を氷水に注ぎ、10 min 撹拌した。濾過し、濾過ケーキを水で 2 回洗浄し、減圧下で濃縮乾固し、残留物に酢酸エチル（2 mL）及び石油エーテル（10 mL）を加え、反応液を 25℃で 0.5 h 撹拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキを乾燥させて表題化合物（500 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 300.0 [M+H]⁺。

【0193】

ステップ 5: 1-(6-アミノベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)-2-クロロエタノン（中間体 14-6）の合成

中間体 14-5（0.2 g、666.43 μmol）を無水エタノール（1 mL）及び濃塩酸（1 mL）に溶解し、反応液を 60℃で 16 h 撹拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、氷水（10 mL）及び飽和炭酸水素ナトリウム（10 mL）を順次にゆっくりと加え、ジクロロメタン（50 mL）を更に加え、有機相を水（20 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。分取薄層クロマトグラフィー（石油エーテル：酢酸エチル=6:1）により、表題化合物 160 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 214.0 [M+H]⁺。

【0194】

ステップ 6: (S)-14-(ブロモメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン（中間体 14-7）の合成

中間体 14-6（50 mg、234.06 μmol）及び中間体 1-3（61.62 mg、234.06 μmol）をトルエン（1 mL）に溶解し、その中に p-トルエンスルホン酸ピリジニウム（5.88 mg、23.41 μmol）を加えた。反応液を 90℃で 16 h 撹拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、エタノール（1 mL）を加え、反応液を 25℃で 0.5 h 撹拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール（2 mL×2）で洗浄した後、乾燥させて表題化合物（60 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 441.1 [M+H]⁺。

【0195】

ステップ 7: (S)-14-(アミノメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,1

10

20

30

40

50

3-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン(中間体14-8)の合成

中間体14-7(55.00mg、124.76 μ mol)をエタノール(1mL)に溶解し、その中にウロトロピン(52.47mg、374.29 μ mol)を加えた。反応液を80℃で1.5h攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μ m、直径25mm、長さ100mm、水(0.225%のギ酸を含む)とメタノールの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、メタノールの勾配比は0%~27%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(10mg)を得た。
MS m/z (ESI): 422.1 [M+H]⁺。

10

【0196】

ステップ8: 2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物14)の合成

中間体14-8(10.00mg、20.17 μ mol)及び中間体11-1(23.42mg、201.71 μ mol)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(0.5mL)に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)(11.50mg、30.26 μ mol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(7.82mg、60.51 μ mol)を加え、反応液を25℃で1.5h攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μ m、直径30mm、長さ150mm、水(0.225%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は4%~44%であり、溶離時間は9分である)、表題化合物(3mg)を得た。

20

MS m/z (ESI): 520.1 [M+H]⁺。

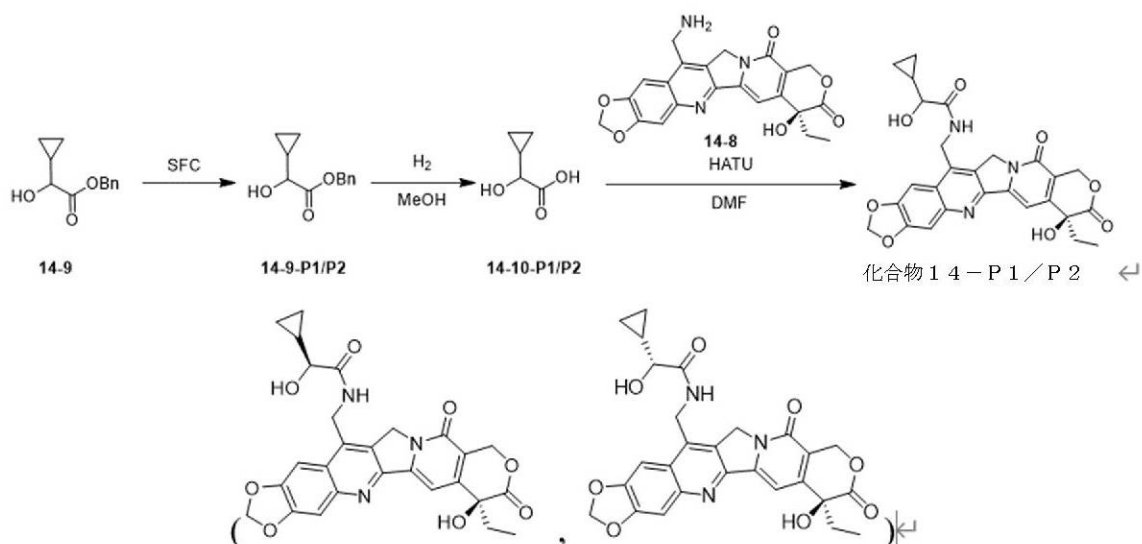
¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.37 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.05 (s, 2H), 5.27 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.48 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 1.66-1.55 (m, 2H), 0.76-0.40 (m, 1H), 0.63 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.14-0.06 (m, 2H), 0.05-0.04 (m, 2H)。

30

40

50

【化 3 7】



10

【0197】

ステップ9：2-シクロプロピル-2-ヒドロキシ酢酸ベンジル（中間体14-9-P1 / P2）の製造

中間体14-9を分割して異性体14-9-P1及び14-9-P2を製造した。中間体14-9（1.3g）を取って、超臨界流体クロマトグラフィーにより製造し（DAICEL CHIRALPAK ADカラム、10 μ mシリカ、直径30mm、長さ250mm、エタノール（0.1%のアンモニア水を含む）を溶離液として使用する）、中間体14-9-P1（600mg）及び中間体14-9-P2（600mg）を得た。

上記の2つの異性体を、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー条件により更に分析した。

【0198】

【表1】

30

カラム	Chiralpak AD-3 150 $\times$ 4.6mm I. D., 3 μ m	
移動相	A：二酸化炭素	
	B：メタノール（0.05%のジエチルアミン）	
	時間（分）	B相%
	0	5
	4	40
	0.2	5
	1.8	5
流速	2.5ミリリットル/分	
波長	PDA 220nm	
カラム温度	35℃	
カラム圧	1500Psi	
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector	

40

中間体14-9-P1：

上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は2.990分であり、

^1H NMR（400MHz，METHANOL- d_4 ） δ 7.43–7.29（m，5H），5.29–5.16（m，2H），3.67（d， J =7.6 Hz，1H），1

50

． 19-1.07 (m, 1H), 0.58-0.38 (m, 4H)。

中間体 14-9-P2:

上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は 2.661 分であり、

^1H NMR (400 MHz, METHANOL- d_4) δ 7.46-7.28 (m, 5H), 5.30-5.16 (m, 2H), 3.67 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 1.21-1.03 (m, 1H), 0.60-0.36 (m, 4H)。

【0199】

ステップ 10: 2-シクロプロピル-2-ヒドロキシ酢酸 (中間体 14-10-P1 / P2) の合成

水素雰囲気下、中間体 14-9-P1 (500 mg) をメタノール (15 mL) に加え、反応液に湿ったパラジウム炭素 (10 mg、10%) を加え、反応液を水素雰囲気下で 25°C で 16 時間攪拌した。反応終了後、反応物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮し、中間体 14-10-P1 (273 mg) を得た。

^1H NMR (400 MHz, METHANOL- d_4) δ 3.63 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 1.21-1.09 (m, 1H), 0.61-0.40 (m, 4H)。

水素雰囲気下、中間体 14-9-P2 (500 mg) をメタノール (15 mL) に加え、反応液に湿ったパラジウム炭素 (10 mg、10%) を加え、反応液を水素雰囲気下で 25°C で 16 時間攪拌した。反応終了後、反応物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮し、中間体 14-10-P2 (279 mg) を得た。

^1H NMR (400 MHz, METHANOL- d_4) δ 3.63 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 1.19-1.08 (m, 1H), 0.60-0.39 (m, 4H)。

【0200】

ステップ 11: 2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 14-P1 / P2) の合成

中間体 14-8 (40.00 mg) 及び中間体 14-10-P1 (28.11 mg) を無水 N,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、その中に 2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU) (46.02 mg) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (31.28 mg) を加え、反応液を 25°C で 1.5 h 攪拌した。反応終了後、反応液を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Green ODS C18 カラム 5 μm シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する (アセトニトリルの勾配比は 16% ~ 46% であり、溶離時間は 12 分である))、化合物 14-P1 (22.00 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 520.1 [M+H]⁺。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.62 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.73 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.54 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 1.93-1.78 (m, 2H), 1.06-0.96 (m, 1H), 0.87 (t, $J=7.3$ Hz, 3H), 0.39-0.30 (m, 2H), 0.29-0.21 (m, 2H)。

【0201】

中間体 14-8 (10.00 mg) 及び中間体 14-10-P2 (8.27 mg) を無水 N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に 2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (18.05 mg) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (6.13 mg) を加え

、反応液を25℃で1.5h攪拌した。反応終了後、反応液を直接に分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（Boston Green ODS C18カラム 5 μ m シリカ、直径30mm、長さ150mm、水（0.225%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する（アセトニトリルの勾配比は16%～46%であり、溶離時間は12分である））、化合物14-P2（8.00mg）を得た。

MS m/z (ESI) : 520.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.72 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.55 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 1.92–1.81 (m, 2H), 1.03–0.97 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.38–0.30 (m, 2H), 0.28–0.22 (m, 2H)。

10

【0202】

2つの異性体を、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0203】

【表2-1】

カラム	Chiralcel OJ-3 100A 4.6mm I.D., 3 μ m
移動相	A : 二酸化炭素
	B : エタノール (0.05%のジエチルアミン)
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 254nm
カラム温度	35℃

20

【表2-2】

カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

30

化合物14-P1 :

上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は3.673分であり、

化合物14-P2 :

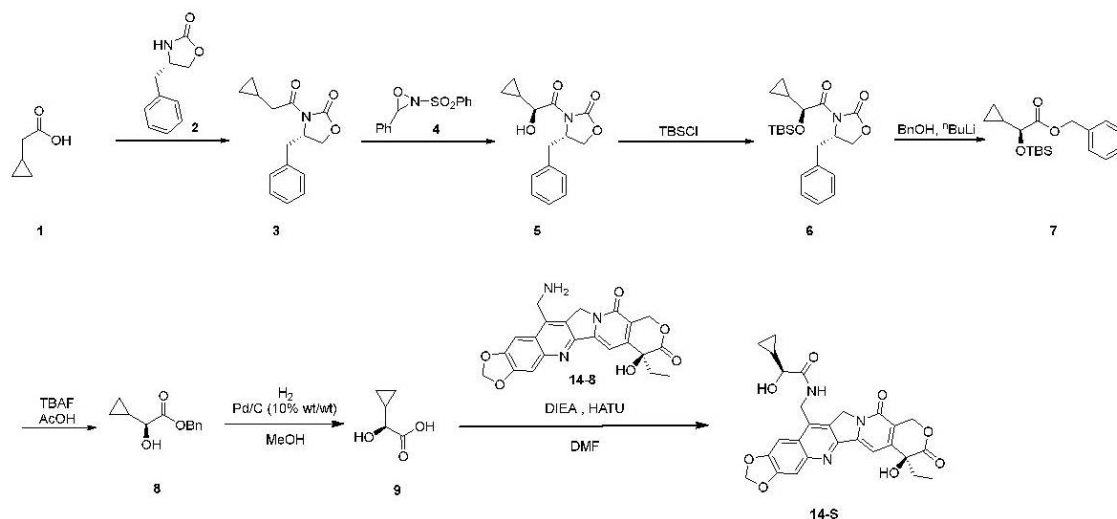
上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は3.735分であった。

【0204】

実施例14-2 : (S)-2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物14-S)

40

【化 3 8】



10

20

30

40

50

ステップ 1：(S)-4-ベンジル-3-(2-シクロプロピルアセチル)オキサゾリジン-2-オン(中間体 3)の合成

出発原料 1 (150.0 g)、4-ジメチルアミノピリジン (160.15 g)、及び出発原料 2 (221.2 g)を秤量し、1500 mL のジクロロメタンに溶解し、室温で 15 min 撹拌した。1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDCI、359.0 g)を秤量し、反応液を数回に分けて加えた後、室温で約 5 h 撹拌した。反応終了後、反応液にジクロロメタン (1500 mL)を加えて希釈した後、順次に水 (500 mL)で 2 回洗浄し、2 N の HCl (500 mL)で 1 回洗浄し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (500 mL)で 1 回洗浄し、飽和食塩水溶液 (500 mL)で 1 回洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固して表題化合物 (302 g)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32–7.35 (m, 2H), 7.26–7.29 (m, 1H), 7.21–7.23 (m, 2H), 4.68–4.71 (m, 1H), 4.17–4.23 (m, 2H), 3.30–3.33 (dd, 1H), 2.91–2.95 (dd, 1H), 2.78–2.82 (m, 2H), 1.14–1.18 (m, 1H), 0.59–0.63 (m, 2H), 0.21–0.26 (m, 2H).
【0205】

ステップ 2：(S)-4-ベンジル-3-((S)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセチル)オキサゾリジン-2-オン(中間体 5)の合成

中間体 3 (200 g)を秤量し、無水テトラヒドロフラン 2000 mL に溶解し、窒素保護下で、 -78°C で 15 min 撹拌した。次に、反応液にナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド (443.5 mL、2 M のテトラヒドロフラン溶液)を滴下した。滴下終了後、反応液を -78°C で 30 min 撹拌した。中間体 4 (201.5 g)をテトラヒドロフラン 700 mL に清澄になるように溶解し、そして反応液にゆっくりと滴下した。滴下終了後、 -78°C で 2 h 撹拌した。その後、反応液に氷酢酸 220 mL を加え、反応液をクエンチした。滴下終了後、室温に徐々に昇温し、反応液に 600 mL の 2 N の HCl を加え、室温 ($20\sim 25^\circ\text{C}$)で 10 h 撹拌した。その後、反応液を減圧下で濃縮し、残留物に酢酸エチル (1000 mL)及び水 (200 mL)を加え、20 min 撹拌した。分離した水相を酢酸エチル (500 mL $\times$ 2)で 2 回抽出し、有機相を合わせ、飽和 NaHCO₃ 溶液 400 mL、飽和 Na₂S₂O₃ 溶液 400 mL 及び飽和食塩水で順次にそれぞれ 2 回洗浄し、得られた有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し(石油エーテル：酢酸エチル=1/30)、表題化合物 (128.7 g)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37 (dd, $J=8.1, 6.8$

H z, 2 H), 7.33–7.29 (m, 1 H), 7.27–7.23 (m, 2 H), 4.81 (dd, J=7.9, 5.9 Hz, 1 H), 4.72 (ddt, J=10.0, 7.5, 2.9 Hz, 1 H), 4.33 (t, J=8.3 Hz, 1 H), 4.28 (dd, J=9.1, 2.5 Hz, 1 H), 3.48 (dd, J=8.2, 3.9 Hz, 1 H), 3.35 (dd, J=13.5, 3.4 Hz, 1 H), 2.88 (dd, J=13.5, 9.4 Hz, 1 H), 1.36–1.29 (m, 1 H), 0.62–0.44 (m, 4 H).

【0206】

ステップ3: (S)-4-ベンジル-3-((S)-2-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-シクロプロピルアセチル)オキサゾリジン-2-オン(中間体6)の合成

10

中間体5(128.7 g)を秤量し、ジクロロメタン1300 mLに溶解し、イミダゾール(56.17 g)を加え、氷浴下で15 min 攪拌した。次いで、反応液にTBSCl(107.3 g)を数回に分けて加え、室温で3 h 攪拌した。反応液に200 mLの2 NのHClを加えて20 min 攪拌し、分液した。有機相を飽和NaHCO₃溶液200 mL及び飽和食塩水で順次にそれぞれ2回洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し(石油エーテル:酢酸エチル=80:1)、表題化合物(160 g)を得た。

20

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.35–7.37 (m, 2 H), 7.30–7.32 (m, 1 H), 7.26–7.29 (m, 2 H), 5.26–5.31 (m, 1 H), 4.67–4.71 (m, 1 H), 4.20–4.26 (m, 2 H), 3.41–3.44 (dd, 1 H), 2.72–2.76 (dd, 1 H), 1.25–1.31 (m, 1 H), 0.94 (s, 9 H), 0.54–0.56 (m, 2 H), 0.46–0.48 (m, 2 H), 0.12 (s, 6 H).

【0207】

ステップ4: (S)-2-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-シクロプロピル酢酸ベンジル(中間体7)の合成

30

ベンジルアルコール(62.18 g)を秤量し、テトラヒドロフラン500 mLに溶解し、-25℃で攪拌した。n-ブチルリチウム(213.6 mL、2.5 Mのテトラヒドロフラン溶液)を量り取り、反応液にゆっくりと滴下した。滴下終了後、-25℃で1 h 攪拌した。中間体6(160 g)を秤量し、テトラヒドロフラン320 mLに溶解し、-25℃で反応液にゆっくりと滴下した。滴下終了後、-15℃で3 h 攪拌した。反応液に飽和NH₄Cl(200 mL)溶液を加えて反応液をクエンチした。その後、減圧下で濃縮し、反応液にメチルtert-ブチルエーテル400 mL及び水(150 mL)を加え、30 min 攪拌し、分液し、水相をメチルtert-ブチルエーテル(200 mL×2)で2回抽出し、有機相を合わせ、飽和食塩水(250 mL)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し(石油エーテル:酢酸エチル=100:1)、表題化合物(125 g)を得た。

40

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.28–7.40 (m, 5 H), 5.17–5.26 (m, 2 H), 3.86–3.89 (m, 1 H), 1.21–1.46 (m, 1 H), 0.90 (s, 9 H), 0.45–0.51 (m, 4 H), 0.05 (s, 6 H).

【0208】

ステップ5: (S)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシ酢酸ベンジル(中間体8)の合成

中間体7(125 g)を秤量し、テトラヒドロフラン1200 mLに溶解し、氷酢酸(35.1 g)を加え、室温で5 min 攪拌した。次いで、反応液にフッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF、585 mL、1 Mのテトラヒドロフラン溶液)を加え、反応液を4

50

5℃で4h反応させた。反応液を減圧下で濃縮してテトラヒドロフラン(600mL)を除去し、残留物に水300mL及びメチルtert-ブチルエーテル400mLを加え、20min攪拌し、分液し、水相をメチルtert-ブチルエーテル(200mL)で2回抽出し、有機相を合わせ、飽和NaHCO₃溶液200mL及び飽和食塩水で順次にそれぞれ2回洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し(石油エーテル：酢酸エチル＝60：1)、表題化合物(68.9g)を得た。

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.27–7.39(m, 5H), 5.22–5.28(m, 2H), 3.82(d, 1H), 2.7(brs, 1H), 1.11–1.15(m, 1H), 0.41–0.56(m, 4H)。

中間体8を、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー条件により更に分析した。

【0209】

【表3】

カラム	Chiralpak AD-3 150×4.6mm I. D., 3 μm	
移動相	A：二酸化炭素	
	B：メタノール(0.05%のジエチルアミン)	
	時間(分)	B相%
	0	5
	4	40
	0.2	5
	1.8	5
流速	2.5ミリリットル/分	
波長	PDA 220nm	
カラム温度	35℃	
カラム圧	1500Psi	
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector	

中間体8は、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.013分であり、実施例14-1の中間体14-9-P1の同じクロマトグラフィー分析条件下での保持時間(2.990分)と基本的に一致し、中間体8と中間体14-9-P1の配置は同じであり、両者は同じ化合物であった。

【0210】

ステップ6：(S)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシ酢酸(中間体9)の合成
中間体8(5g)をメタノール(80mL)に溶解し、反応液に湿ったパラジウム炭素(質量含有量10%、0.7g)を加え、水素雰囲気下で、25℃で16h攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固した後、表題化合物(2.4g)を得た。

¹H NMR(400 MHz, METHANOL-d₄) δ = 3.63(d, J = 7.3 Hz, 1H), 1.20–1.09(m, 1H), 0.61–0.39(m, 4H)。

ステップ7：(S)-2-シクロプロピル-N-(((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物14-S)の合成

中間体14-8(90mg)及び中間体9(49.60mg)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(1mL)に溶解し、その中にO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフィン塩(121.81mg)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(82.81mg)を加え、反応液を25℃で16h攪拌した。反応終了後、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより精製

し（カラム：Boston Green ODS 150×30mm×5μm、移動相：[A：水（0.225%のギ酸）、B：アセトニトリル]、B%：20%～50%、12min）、表題化合物（21mg）を得た。

MS m/z (ESI)：520.0 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.62 (t, J=6.1 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.73 (d, J=5.6 Hz, 2H), 3.54 (d, J=5.5 Hz, 1H), 1.93–1.80 (m, 2H), 1.05–0.97 (m, 1H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H), 0.39–0.30 (m, 2H), 0.30–0.22 (m, 2H)。

化合物14-Sを、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー条件により更に分析した。

【0211】

【表4】

カラム	Chiralcel OJ-3 100A 4.6mm I. D., 3μm
移動相	A：二酸化炭素
	B：エタノール（0.05%のジエチルアミン）
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 254nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

化合物14-Sは、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.654分であり、実施例14-1で製造された化合物14-P1の同じクロマトグラフィー分析条件下での保持時間（3.673分）と基本的に一致した。従って、化合物14-Sと実施例14-1で製造された化合物14-P1の配置は同じであり、両者は同じ化合物であると判断した。

【0212】

実施例15、(S)-N-((9-ブロモ-4-エチル-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b][1,7]ナフチリジン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物15）

10

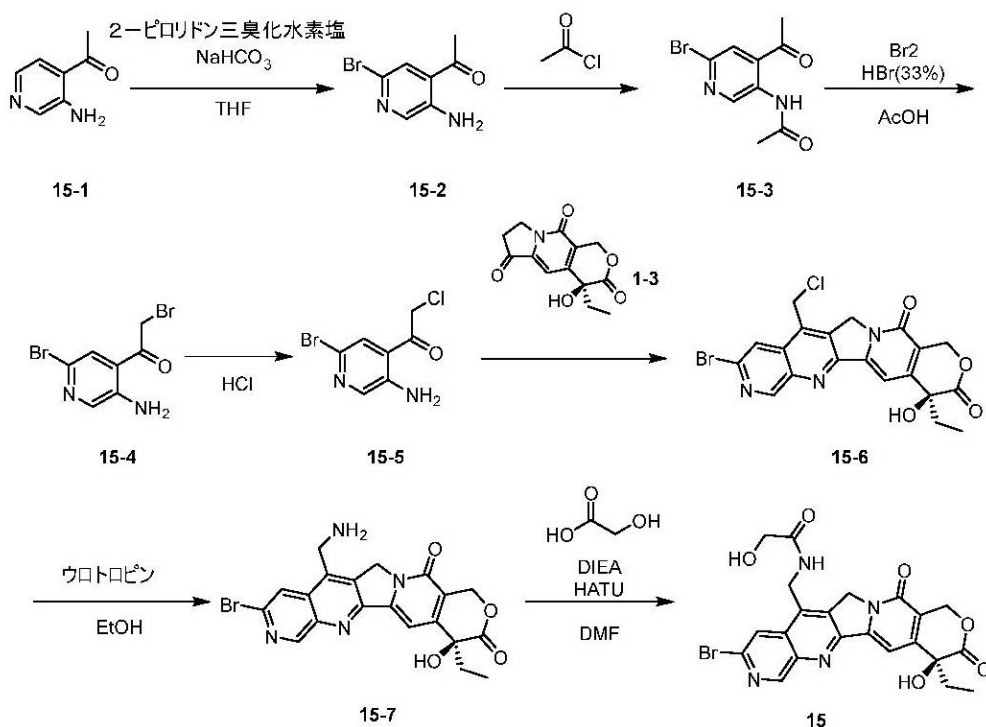
20

30

40

50

【化 3 9】



10

20

ステップ 1：1-（5-アミノ-2-ブロモピリジン-4-イル）エタノン（中間体 15-2）の合成

中間体 15-1（500 mg、3.67 mmol）を無水テトラヒドロフラン（90 mL）に溶解し、その中に炭酸水素ナトリウム（617.04 mg、7.34 mmol）及び 2-ピロリドン三臭化水素塩（1.64 g、5.03 mmol）を加え、反応液を 25℃で 8 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取薄層クロマトグラフィー（シリカ、石油エーテル：酢酸エチル＝20：1）により、表題化合物（300 mg）を得た。

MS m/z (ESI)：214.9 [M+H]⁺。

【0213】

30

ステップ 2：N-（4-アセチル-6-ブロモピリジン-3-イル）アセトアミド（中間体 15-3）の合成

中間体 15-2（150 mg、697.52 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、反応液を 0℃に冷却し、その中に N,N-ジイソプロピルエチルアミン（180.30 mg、1.40 mmol）及び塩化アセチル（109.51 mg、1.40 mmol）を加えた。反応液を 25℃で 3 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、分取薄層クロマトグラフィー（シリカ、石油エーテル：酢酸エチル＝3：1）により、表題化合物（100 mg）を得た。

MS m/z (ESI)：257.0 [M+H]⁺。

【0214】

40

ステップ 3：1-（5-アミノ-2-ブロモピリジン-4-イル）-2-ブロモエタノン（中間体 15-4）の合成

中間体 15-3（95.00 mg、273.45 μmol）を酢酸（2 mL）に溶解し、その中に臭化水素の酢酸溶液（100.57 g、410.18 μmol、純度 33%）を加え、更にその中に液体臭素（48.07 mg、300.80 μmol）をゆっくりと加え、反応液を 25℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、分取薄層クロマトグラフィー（シリカ、石油エーテル：酢酸エチル＝3：1）により、表題化合物（45 mg）を得た。

MS m/z (ESI)：292.9 [M+H]⁺。

【0215】

50

ステップ4：1-(5-アミノ-2-ブロモピリジン-4-イル)-2-クロロエタノン
(中間体15-5)の合成

中間体15-4 (50.00 mg、170.10 μmol)を濃塩酸(1 mL)に溶解し、反応液を60℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、氷水(10 mL)及び飽和炭酸水素ナトリウム(10 mL)を順次にゆっくりと加え、ジクロロメタン(30 mL)を更に加え、有機相を水(20 mL $\times$ 2)で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮乾固して表題化合物(25 mg)を得た。

MS m/z (ESI): 248.9 [M+H]⁺.

[0216]

ステップ5：(S)-9-ブロモ-11-(クロロメチル)-4-エチル-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b][1,7]ナフチリジン-3,14(4H)-ジオン(中間体15-6)の合成

中間体15-5 (25 mg、100.20 μmol)及び中間体1-3 (26.38 mg、100.20 μmol)をトルエン(0.5 mL)に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム(2.52 mg、10.02 μmol)を加えた。反応液を90℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、エタノール(1 mL)を加え、反応液を25℃で0.5 h 攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール(2 mL $\times$ 2)で洗浄して表題化合物(30 mg)を得た。

MS m/z (ESI): 475.9 [M+H]⁺.

[0217]

ステップ6：(S)-11-(アミノメチル)-9-ブロモ-4-エチル-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b][1,7]ナフチリジン-3,14(4H)-ジオン(中間体15-7)の合成

中間体15-6 (30 mg、62.93 μmol)をエタノール(1 mL)に溶解し、その中にウロトロピン(17.64 mg、125.86 μmol)を加えた。反応液を80℃で2 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18 カラム 5 μm 、直径25 mm、長さ100 mm、水(0.225%のギ酸を含む)とメタノールの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、メタノールの勾配比は0%~25%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(4 mg)を得た。

MS m/z (ESI): 457.0 [M+H]⁺.

[0218]

ステップ7：(S)-N-((9-ブロモ-4-エチル-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b][1,7]ナフチリジン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物15)の合成

中間体15-7 (4 mg、8.75 μmol)及びヒドロキシ酢酸(3.33 mg、43.74 μmol)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(0.5 mL)に溶解し、その中にHATU(4.99 mg、13.12 μmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.39 mg、26.24 μmol)を加え、反応液を25℃で2 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18 カラム 5 μm 、直径25 mm、長さ100 mm、水(0.05%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は8%~28%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(1.00 mg)を得た。

MS m/z (ESI): 515.0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.38 (s, 1H), 8.88 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.64-5.61 (m, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.45 (

10

20

30

40

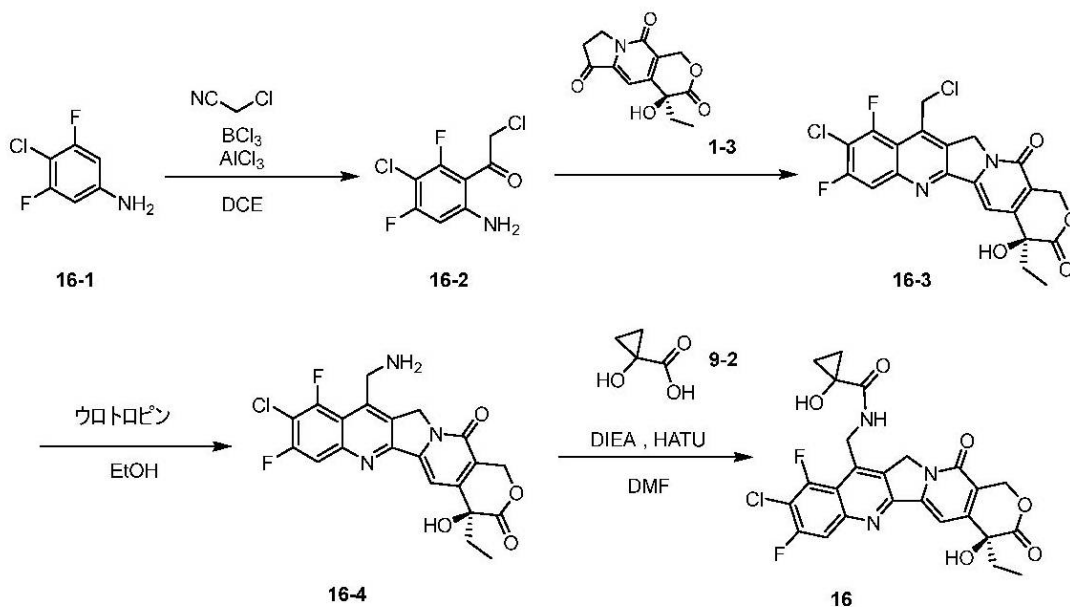
50

s, 2 H), 4.80 (d, J = 6.0 Hz, 2 H), 3.83 (d, J = 5.7 Hz, 2 H), 1.92–1.80 (m, 2 H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3 H)。

【0219】

実施例 16、(S)-N-(9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-1-ヒドロキシシクロプロパン-1-カルボキサミド (化合物 16)

【化 40】



ステップ 1：1-(6-アミノ-3-クロロ-2,4-ジフルオロフェニル)-2-クロロエタン-1-オン (中間体 16-2) の合成

三塩化ホウ素 (1 M、6.11 mL) を 1,2-ジクロロエタン (12 mL) に溶解し、反応液を 0℃ に降温し、その中に反応物 16-1 (1 g、6.11 mmol) 及びクロロアセトニトリル (784.73 mg、10.39 mmol) を加え、反応液を 0℃ で 10 min 攪拌し、その中に三塩化アルミニウム (1.06 g、7.95 mmol) を加えた。その後、反応液を窒素保護下で 25℃ に昇温して 10 min 攪拌した。反応液を窒素保護下で 90℃ で 18 h 攪拌した。LC-MS で反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、氷水 (25 mL) 及び 5% の塩酸 (5 mL) を順次にゆっくりと加えて 25℃ で 30 min 攪拌し、ジクロロメタン (50 mL) を更に加え、有機相を水 (2 mL × 2) で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下で濃縮乾固し、粗生成物を分取薄層クロマトグラフィー (シリカ、石油エーテル：酢酸エチル = 9 : 1) に付して、表題化合物 (340 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 240.0 [M+H]⁺。

【0220】

ステップ 2：(S)-9-クロロ-11-(クロロメチル)-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン (中間体 16-3) の合成

中間体 16-2 (0.2 g、833.22 μmol) 及び中間体 1-3 (219.34 mg、833.22 μmol) をトルエン (4 mL) に溶解し、その中に p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (20.94 mg、83.32 μmol) を加えた。反応液を 100℃ で 18 h 攪拌した。LC-MS で反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、エタノール (1 mL) を加え、反応液を 25℃ で 0.5 h 攪拌した。反応液を濾

過し、濾過ケーキをエタノール（2 mL × 2）で洗浄し、表題化合物の粗生成物（190 mg）を得た。

MS m/z (ESI) : 467.1 [M+H]⁺。

【0221】

ステップ3: (S)-11-(アミノメチル)-9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-1,12-ジヒドロ-14H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14(4H)-ジオン(16-4)の合成
 中間体16-3(50 mg、107.01 μmol)をエタノール(1 mL)に溶解し、その中にウロトロピン(45.00 mg、321.03 μmol)を加えた。反応液を80℃で1.5 h 攪拌した。LC-MSで反応が完了したことを検出した。反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm シリカ、直径25 mm、長さ100 mm、水(0.225%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は2%~32%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(1.22 mg)を得た。

MS m/z (ESI) : 448.0 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.14 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 4.35 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 1.94-1.83 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

【0222】

ステップ4: (S)-N-((9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-1-ヒドロキシシクロプロパン-1-カルボキサミド(化合物16)の合成

化合物16-4(5.75 mg、12.84 μmol)及び中間体9-2(3.93 mg、38.52 μmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.5 mL)に溶解し、その中にHATU(7.32 mg、19.26 μmol)及びジイソプロピルエチルアミン(4.98 mg、38.52 μmol)を加え、反応液を30℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm 、直径25 mm、長さ100 mm、水(0.225%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は14%~34%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物(3 mg)を得た。

MS m/z (ESI) : 532.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.46 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.93 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.04-0.99 (m, 2H), 0.90-0.87 (m, 2H), 0.87-0.82 (m, 3H)。

【0223】

実施例17、(S)-N-((8-クロロ-4-エチル-4-ヒドロキシ-9-メチル-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシ-2-メチルプロパンアミド(化合物17)

10

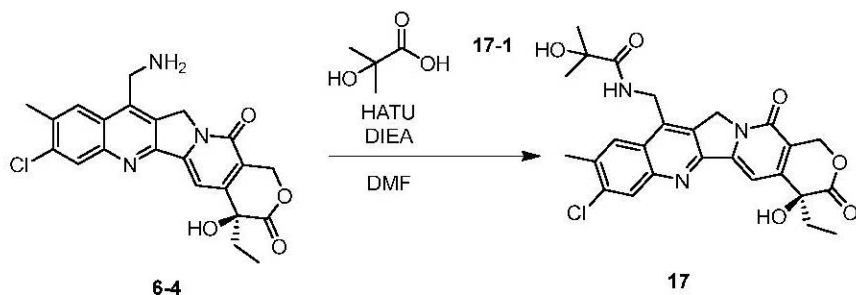
20

30

40

50

【化 4 1】



10

中間体 6-4 (5 mg、11.74 μmol) 及び中間体 17-1 (2.44 mg、23.48 μmol) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (8.95 mg、23.48 μmol) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.19 mg、11.74 μmol) を加え、反応液を 25℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μm シリカ、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 22% ~ 42% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (1 mg) を得た。

20

MS m/z (ESI): 512.1 $[M+H]^+$ 。

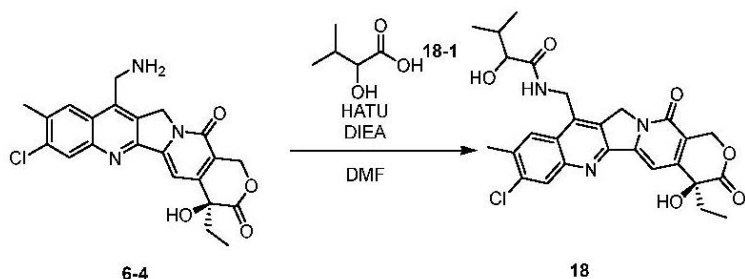
^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ = 8.32 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 5.62 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.42 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.05–1.94 (m, 2H), 1.38 (s, 6H), 1.03 (t, J = 7.5 Hz, 3H)。

【0224】

実施例 18、N-((S)-8-クロロ-4-エチル-4-ヒドロキシ-9-メチル-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシ-3-メチルブタンアミド (化合物 18)

30

【化 4 2】



40

中間体 6-4 (5 mg、11.74 μmol) 及び中間体 18-1 (2.77 mg、23.48 μmol) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (8.95 mg、23.48 μmol) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.19 mg、11.74 μmol) を加え、反応液を 25℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μm 、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 25% ~ 45% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (1.20 mg) を得た。

50

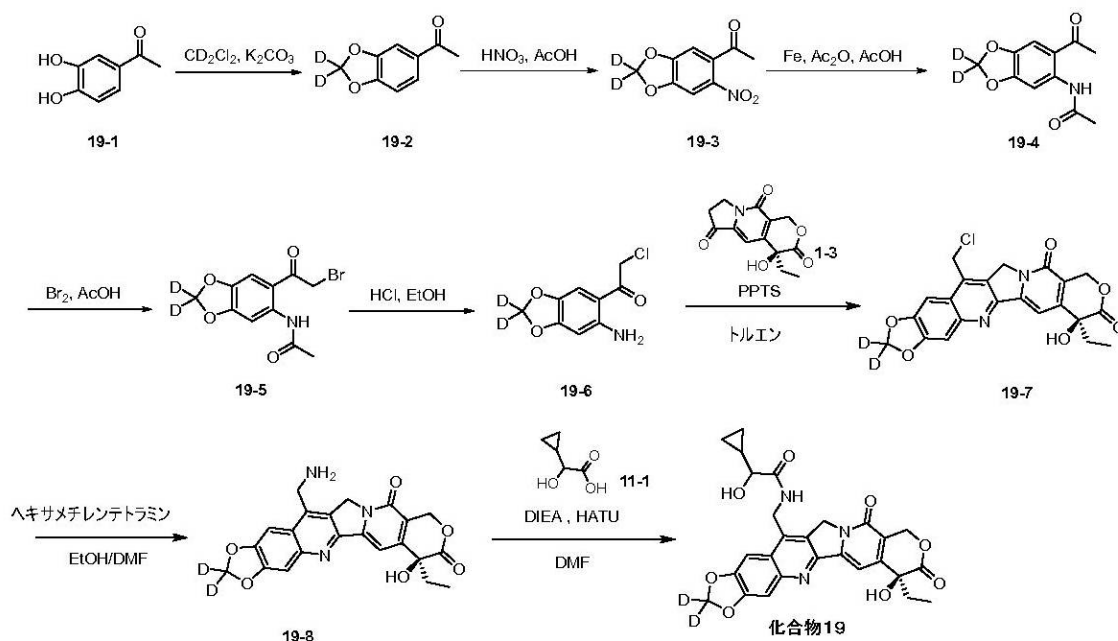
MS m/z (ESI): 526.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ = 8.30 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 5.60 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 5.56–5.45 (m, 2H), 5.42–5.37 (m, 1H), 5.00–4.90 (m, 2H), 3.91 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 3.13 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H), 2.01–1.94 (m, 2H), 1.05–1.00 (m, 6H), 0.77–0.70 (m, 3H)。

【0225】

実施例 19-1、2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル-2,2-d₂)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 19、化合物 19-P1/P2)

【化 43】



ステップ 1：1-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル-2,2-d₂)エタン-1-オン (中間体 19-2) の合成

中間体 19-1 (3 g) を無水 DMF 溶液 (25 mL) に溶解し、重水素化ジクロロメタン (8.57 g) 及び炭酸カリウム (8.18 g) を加えた後、90℃ に加温して 16 h 攪拌した。次いで、反応液を水 (100 mL) に加え、酢酸エチル (200 mL × 2) で抽出し、有機相を合わせて飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製し (酢酸エチル/石油エーテル = 5 : 1)、表題化合物 (2.4 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 167.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

【0226】

ステップ 2：1-(6-ニトロベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル-2,2-d₂)エタン-1-オン (中間体 19-3) の合成

中間体 19-2 (2.4 g) を無水酢酸 (10 mL) に溶解し、0℃ で濃硝酸 (32.50 g、含有量 70%) を滴下し、加入完了後、0℃ で 10 min 攪拌した。次いで室温に昇温し、1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を氷水 (200 mL) に滴下し、濾過した後、濾過ケーキを乾燥させて表題化合物 (1.9 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 212.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.69 (s, 1H), 7.30 (

s, 1 H), 2.49 (s, 3 H).

【0227】

ステップ3: N-(6-アセチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル-2,2-d₂)アセトアミド(中間体19-4)の合成

中間体19-3(1.8 g)を酢酸(25 mL)に溶解し、無水酢酸(1.84 g)及び還元鉄粉(4.76 g)を加え、室温で1 h 攪拌した。反応終了後、濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製し(酢酸エチル/石油エーテル=5:1)、表題化合物(1.5 g)を得た。

MS m/z (ESI): 224.1 [M+H]⁺。

【0228】

ステップ4: N-(6-(2-ブロモアセチル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル-2,2-d₂)アセトアミド(中間体19-5)の合成

HBrの酢酸溶液(2.39 g、含有量33%)を、中間体19-4(1.45 g)の無水酢酸(25 mL)溶液に滴下し、次いでBr₂(1.07 g)を滴下し、滴下終了後、室温で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を水(50 mL)に加え、酢酸エチル(50 mL×2)で抽出し、有機相を飽和食塩水(50 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製し(酢酸エチル/石油エーテル=5:1)、表題化合物(1.3 g)を得た。

MS m/z (ESI): 302.1 [M+H]⁺。

【0229】

ステップ5: 1-(6-アミノベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル-2,2-d₂)-2-クロロエタン-1-オン(中間体19-6)の合成

中間体19-5(1.2 g)及び濃塩酸(144.82 mg)をエタノール(15 mL)に溶解し、反応液を60℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Actus Triart C18カラム 5 µmシリカ、直径30 mm、長さ150 mm、水(0.05%のNH₄HCO₃を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する(アセトニトリルの勾配比は40%~50%である))、表題化合物(577 mg)を得た。

MS m/z (ESI): 216.0 [M+H]⁺。

【0230】

ステップ6: (S)-14-(クロロメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン-2,2-d₂(中間体19-7)の合成

中間体19-6(100.0 mg)及び中間体1-3(109.87 mg)をトルエン(1 mL)及び酢酸(1 mL)に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム(5.24 mg)を加えた。反応液を100℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、直接に反応液を減圧下で濃縮乾固した。エタノール(5 mL)を加え、反応液を25℃で0.5 h 攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール(5 mL×2)で洗浄して表題化合物(100.0 mg)を得た。

MS m/z (ESI): 443.0 [M+H]⁺。

【0231】

ステップ7: (S)-14-(アミノメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン-2,2-d₂(中間体19-8)の合成

中間体19-7(100.00 mg)を無水エタノール(1.5 mL)及び無水N,N-ジメチルホルムアミド(1.5 mL)に溶解し、その中にウロトロピン(94.97 mg)を加えた。反応液を50℃で6 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し

10

20

30

40

50

、残留物を高速液体クロマトグラフィーにより精製し（カラム：Boston Green ODS 150×30mm×5μm、移動相：[A：水（ギ酸）、B：アセトニトリル]、B%：0%～30%、12min）、表題化合物（25.0mg）を得た。

MS m/z (ESI)：424.0 [M+H]⁺。

【0232】

ステップ8：2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル-2,2-d₂)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物19）の合成
中間体19-8（7mg）及び中間体11-1（5.76mg）を無水N,N-ジメチルホルムアミド（0.5mL）に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（12.57mg）及びジイソプロピルエチルアミン（4.27mg）を加え、反応液を25℃で1h攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（Waters Xbridge C18カラム 5μm、直径25mm、長さ100mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する（アセトニトリルの勾配比は20%～50%であり、溶離時間は12分である））、表題化合物（2.60mg）を得た。

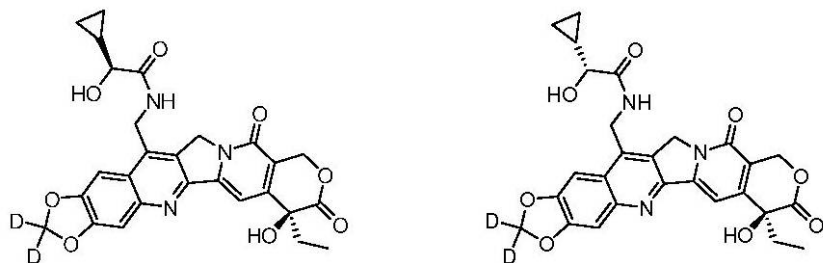
MS m/z (ESI)：522.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.62 (t, J=5.9 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.48-5.41 (m, 5H), 4.72 (d, J=5.5 Hz, 2H), 3.59-3.52 (m, 1H), 2.00-1.76 (m, 2H), 1.05-0.96 (m, 1H), 0.88 (t, J=7.4 Hz, 3H), 0.37-0.30 (m, 2H), 0.29-0.19 (m, 2H)。

【0233】

ステップ9：2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル-2,2-d₂)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物19-P1/P2）の合成

【化44】



中間体19-8（7mg）及び中間体14-10-P1（5.76mg）を無水N,N-ジメチルホルムアミド（0.5mL）に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（12.57mg）及びジイソプロピルエチルアミン（4.27mg）を加え、反応液を25℃で1h攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（Waters Xbridge C18カラム 5μm、直径25mm、長さ100mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は15%～45%であり、溶離時間は12分である）、化合物19-P1（3.30mg）を得た。

MS m/z (ESI) : 522.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.54–5.51 (m, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.72 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.55–3.53 (m, 1H), 1.94–1.78 (m, 2H), 1.05–0.96 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.40–0.30 (m, 2H), 0.29–0.19 (m, 2H)。

【0234】

中間体19-8 (7 mg) 及び中間体14-10-P2 (5.76 mg) を無水N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (12.57 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (4.27 mg) を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μ m、直径25 mm、長さ100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する (アセトニトリルの勾配比は15% ~ 45% であり、溶離時間は12分である))、化合物19-P2 (4.0 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 522.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.62 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.54–5.51 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.72 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.55–3.52 (m, 1H), 1.94–1.80 (m, 2H), 1.04–0.95 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.39–0.30 (m, 2H), 0.29–0.21 (m, 2H)。

【0235】

2つの異性体を、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0236】

【表5】

カラム	Chiralcel OD-3 50A 4.6 mm I. D., 3 μ m
移動相	A : 二酸化炭素
	B : エタノール (0.05% のジエチルアミン)
流速	4 ミリリットル/分
波長	PDA 254 nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500 Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

【0237】

化合物19-P1 :

上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は2.877分であり、化合物19-P2 :

上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は2.690分であった。

【0238】

化合物 19-P1 の配置確認 (X 線単結晶回折法)

単結晶培養方法：化合物 19-P1 サンプル 10 mg を秤量して 1.5 mL の遠心分離管に入れ、ピリジン 300 μ L を加え、超音波で清澄になるように溶解した後、封止膜で封止し、針で封止膜に 3 つの小孔を開け、20～30℃で 48 h ゆっくりと揮発させ、針状結晶を得た。

【0239】

得られた単結晶サンプルに対して X-線分析を行い、試験結果は表 1 及び図 1 に示される。

【0240】

【表 6-1】

10

表 1 化合物 19-P1 の単結晶サンプル及び結晶データ

化学式	$C_{27}H_{23}D_2N_3O_8, H_2O, 2(C_5H_5N)$
化学式量	697.73
結晶系	単斜
空間群	P 1 2 1 1
a, Å	a = 13.7058 (5)
b, Å	b = 6.7026 (3)
c, Å	c = 18.6204 (7)
α , deg	90
β , deg	97.727 (3)
γ , deg	90
体積, Å ³	1695.02 (12)

20

【表 6-2】

Z	2
D_{calc} , g cm ⁻³	1.367
温度, K	193
放射 (波長)	Cu K α (1.54178)
機器	BRUKER D8 VENTURE
h, k, l の範囲	-15 $\leq$ h $\leq$ 17, -8 $\leq$ k $\leq$ 7, -23 $\leq$ l $\leq$ 23
θ 範囲	3.254-79.721
プログラム	SHELXL-2014
収集されたデータ	25136
Unique data	6674
R (F _o)	0.0571
R _w (F _o ²)	0.1713
適合度	1.045
絶対配置の測定	0.04 (11)

30

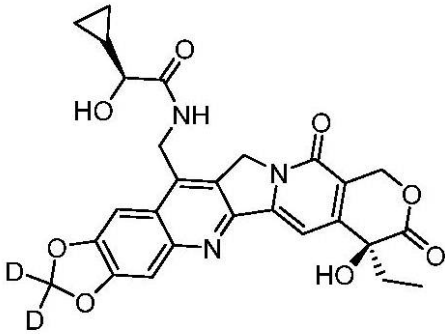
40

【0241】

上記 X-線結晶回折実験により、化合物 19-P1 の化学構造を、

50

【化 4 5】



10

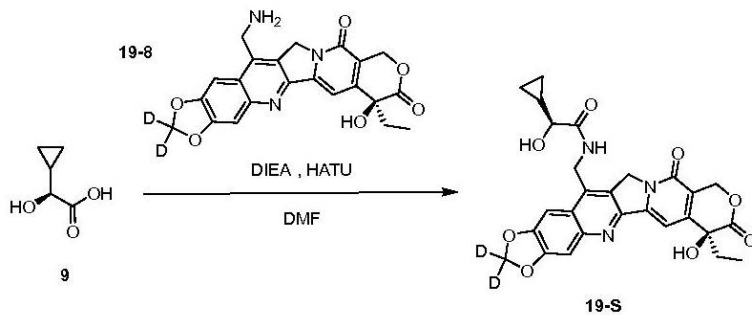
と決定した。

【0242】

実施例 19-2、(S)-2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル-2,2-d₂)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物 19-S)の合成

【化 4 6】

20



30

中間体 19-8 (2.4 g) 及び中間体 9 (1645.5 mg) を無水 N,N-ジメチルホルムアミド (25 mL) に溶解し、その中に O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N,N-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフィン塩 (3.24 g) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1465.11 mg) を加え、反応液を 25℃ で 3 h 攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物に酢酸エチル (100 mL) を加えて 16 時間攪拌した。濾過後、濾過ケーキにメタノール (50 mL) を加えて 16 時間攪拌した。濾過後、表題化合物 (1.6 g) を得た。

MS m/z (ESI): 522.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.60 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.49 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.47-5.37 (m, 4H), 4.71 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.54 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 1.97-1.75 (m, 2H), 1.07-0.94 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.40-0.29 (m, 2H), 0.29-0.20 (m, 2H)。

40

【0243】

化合物 19-S を、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0244】

50

【表 7】

カラム	Chiralcel OD-3 50A 4.6mm I. D., 3 μ m
移動相	A: 二酸化炭素
	B: エタノール (0.05%のジエチルアミン)
流速	4ミリリットル/分
波長	PDA 254nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

10

【0245】

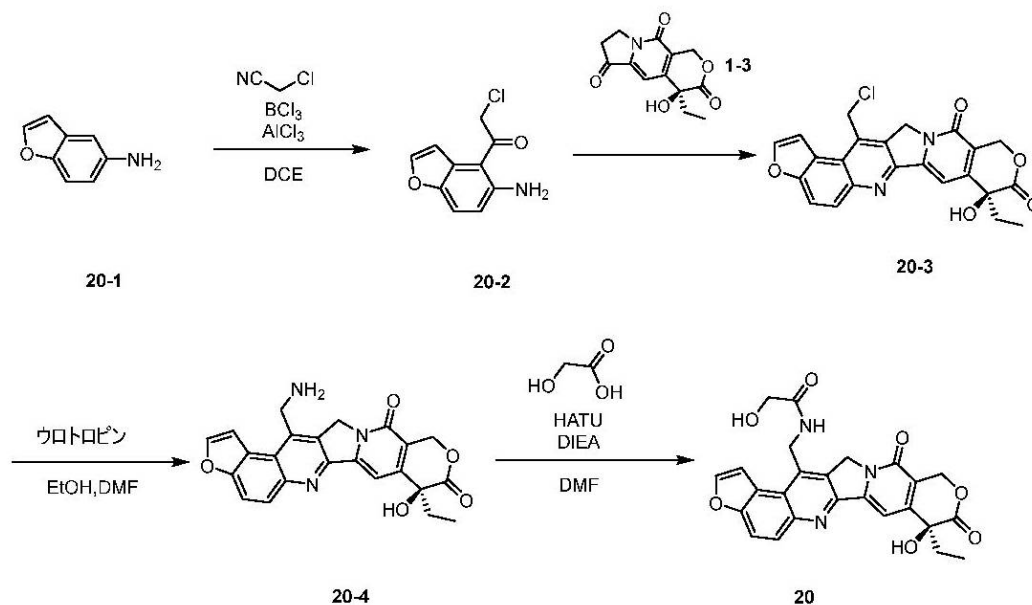
本実施例で製造された化合物 19-S は、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が 2.853 分であり、実施例 19-1 で製造された化合物 19-P の同じクロマトグラフ条件下での保持時間 (2.877 分) と基本的に一致した。従って、化合物 19-S と化合物 19-P の配置は同じであり、同じ化合物であると判断した。

【0246】

実施例 20、(S)-N-((8-エチル-8-ヒドロキシ-9,12-ジオキソ-8,9,12,14-テトラヒドロ-11H-フロ[3,2-f]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 20)

20

【化 47】



30

40

ステップ 1: 1-(5-アミノベンゾフラン-4-イル)-2-クロロエタノン (中間体 20-2) の合成

三塩化ホウ素 (1M、9.61mL) をジクロロエタン (14mL) に溶解し、反応液を 0℃に降温し、その中に中間体 20-1 (1.6g、12.02mmol) 及びクロロアセトニトリル (1.36g、18.03mmol) を加え、反応液を 0℃で 10min 攪拌し、その中に三塩化アルミニウム (1.92g、14.42mmol) を加えた。反応液を窒素保護下で 25℃に昇温して 10min 攪拌した。反応液を窒素保護下で 90℃で 18h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却し、氷水 (50mL) 及び 5% の HCl (10mL) を順次にゆっくりと加えて 25℃で 30min 攪拌し、ジクロロメタン (

50

60 mL) を更に加え、有機相を水 (30 mL × 2) で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。分取薄層クロマトグラフィー (石油エーテル : (酢酸エチル + エタノール = 3 : 1) = 9 : 1) により、表題化合物 (300 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 210.0 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ = 7.72 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H)

[0247]

ステップ2 : (S) - 15 - (クロロメチル) - 8 - エチル - 8 - ヒドロキシ - 11, 14 - ジヒドロ - 12H - フロ [3, 2-f] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 9, 12 (8H) - ジオン (中間体 20-3) の合成

中間体 20-2 (200 mg、954.07 μ mol) 及び中間体 1-3 (251.15 mg、954.07 μ mol) を無水トルエン (4 mL) に溶解し、その中に p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (23.98 mg、95.41 μ mol) を加え、反応液を窒素保護下で 90 °C で 16 h 撹拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却し、反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール (3 mL × 2) で洗浄し、表題化合物 (300 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 437.1 [M+H]⁺。

[0248]

ステップ3 : (S) - 15 - (アミノメチル) - 8 - エチル - 8 - ヒドロキシ - 11, 14 - ジヒドロ - 12H - フロ [3, 2-f] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 9, 12 (8H) - ジオン (中間体 20-4) の合成

中間体 20-3 (70 mg、160.24 μ mol) をエタノール (0.5 mL) 及び無水 N, N - ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中にウロトロピン (89.85 mg、640.96 μ mol) を加えた。反応液を 25 °C で 3 h 撹拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却し、減圧下で濃縮乾固し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (YMC-Actus Triart C18 カラム 5 μ m、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.225 % のギ酸を含む) とメタノールの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、メタノールの勾配比は 5 % ~ 25 % であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (17 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 418.1 [M+H]⁺。

[0249]

ステップ4 : (S) - N - ((8 - エチル - 8 - ヒドロキシ - 9, 12 - ジオキソ - 8, 9, 12, 14 - テトラヒドロ - 11H - フロ [3, 2-f] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン - 15 - イル) メチル) - 2 - ヒドロキシアセトアミド (化合物 20)

中間体 20-4 (5.00 mg、11.98 μ mol) 及びヒドロキシ酢酸 (4.55 mg、59.89 μ mol) を無水 N, N - ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (6.83 mg、17.97 μ mol) 及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (4.64 mg、35.94 μ mol) を加え、反応液を 25 °C で 1 h 撹拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (YMC-Actus Triart C18 カラム 5 μ m、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05 % のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 15 % ~ 35 % であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (3 mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 476.2 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.48 - 8.41 (m, 1H), 8.35 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.58 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.52 (s,

10

20

30

40

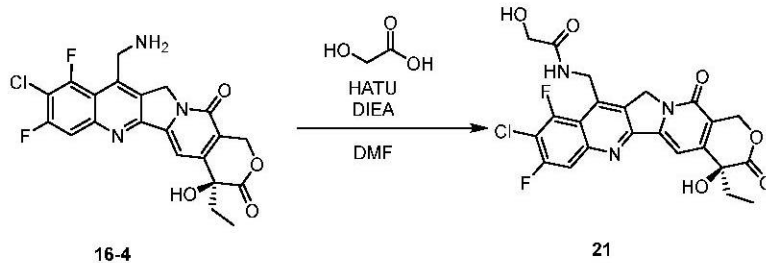
50

2 H), 5.45 (s, 2 H), 5.10 (d, $J=5.3$ Hz, 2 H), 3.88 (d, $J=5.6$ Hz, 2 H), 1.93–1.82 (m, 2 H), 0.89 (t, $J=7.2$ Hz, 3 H)。

【0250】

実施例 21、(S)-N-((9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 21)

【化 48】



化合物 16-4 (7 mg、15.63 μmol) 及びヒドロキシ酢酸 (1.78 mg、25.48 μmol) を無水 N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (11.89 mg、31.26 μmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (2.02 mg、15.63 μmol) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μm 、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05 % のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 20 % ~ 40 % であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (1 mg) を得た。

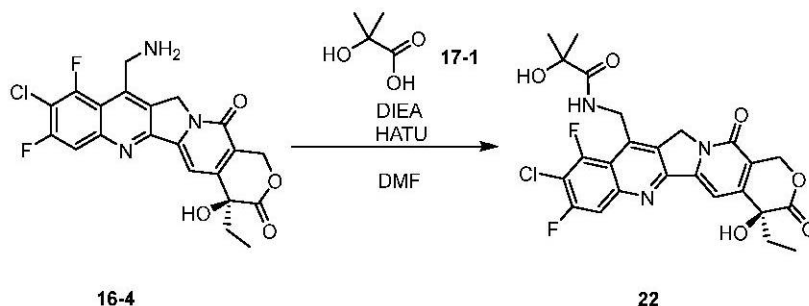
MS m/z (ESI): 506.1 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ = 8.35 (t, $J=5.8$ Hz, 1 H), 8.15 (dd, $J=1.8, 9.8$ Hz, 1 H), 7.36 (s, 1 H), 6.57 (s, 1 H), 5.59–5.50 (m, 3 H), 5.45 (s, 2 H), 4.91 (d, $J=3.2$ Hz, 2 H), 3.84 (d, $J=5.7$ Hz, 2 H), 1.90–1.80 (m, 2 H), 0.87 (t, $J=7.3$ Hz, 3 H)。

【0251】

実施例 22、(S)-N-((9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-ヒドロキシ-2-メチルプロパンアミド (化合物 22)

【化 49】



化合物 16-4 (20 mg、44.66 μmol) 及び中間体 17-1 (13.95 mg、133.98 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、そ

の中にHATU (25.47 mg、66.99 μmol) 及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (17.32 mg、133.98 μmol) を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm 、直径25 mm、長さ100 mm、水 (0.225%のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は20%~40%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物 (1.07 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 534.2 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.30 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.19–8.07 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.55–5.45 (m, 3H), 5.45 (s, 2H), 4.90 (d, J = 3.7 Hz, 2H), 1.90–1.82 (m, 2H), 1.24 (d, J = 4.3 Hz, 6H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

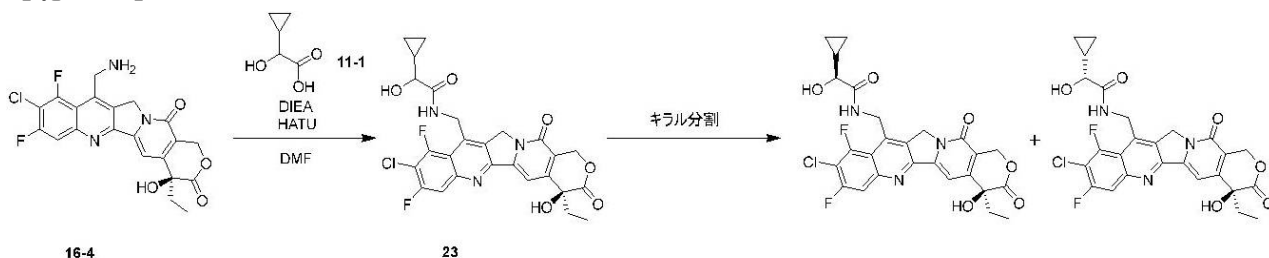
10

【0252】

実施例23、N-((S)-9-クロロ-4-エチル-8, 10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3, 14-ジオキソ-3, 4, 12, 14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-11-イル)メチル)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物23)

【化50】

20



化合物16-4 (7.0 mg、15.63 μmol) 及び中間体11-1 (9.08 mg、78.16 μmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中にHATU (8.92 mg、23.45 μmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (6.06 mg、46.89 μmol) を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (YMC-Actus Triart C18カラム 5 μm 、直径25 mm、長さ100 mm、水 (0.225%のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は41%~61%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物 (7 mg) を得た。

30

MS m/z (ESI): 546.2 $[M+H]^+$ 。

【0253】

化合物23 (7 mg) を、分取超臨界流体クロマトグラフィーにより分離精製し (カラム: DAICEL CHIRALCEL OD-H (250 mm $\times$ 30 mm、5 μm)、移動相: A: 二酸化炭素、B: エタノール、B%: 50%、流速: 80 ミリリットル/分)、化合物23-1 (2.1 mg、RT: 5.106 min) 及び化合物23-2 (2.09 mg、RT: 5.641 min) を得た。

40

【0254】

化合物23-1:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.32 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.47 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.93–4.86 (m, 2H), 2.02–1.96 (m, 1H), 1.91–1.81 (m, 2H), 1.04–0.96 (m, 1H), 0.87 (t, J

50

= 7.3 Hz, 3H), 0.37–0.31 (m, 2H), 0.29–0.23 (m, 2H)

MS m/z (ESI): 546.2 [M+H]⁺.

【0255】

化合物23-2:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.37–8.29 (m, 1H), 8.15 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.50–5.46 (m, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.96–4.86 (m, 2H), 2.10–1.95 (m, 1H), 1.92–1.81 (m, 2H), 1.04–0.98 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.40–0.31 (m, 2H), 0.30–0.25 (m, 2H)

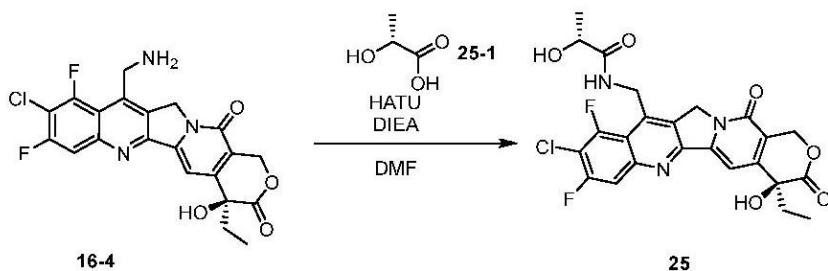
10

MS m/z (ESI): 546.2 [M+H]⁺.

【0256】

実施例25、(R)-N-((S)-9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル-2-ヒドロキシプロパンアミド(化合物25)

【化51】



20

化合物16-4 (6 mg、13.40 μmol) 及び中間体25-1 (2.41 mg、26.80 μmol) を無水N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中にHATU (10.09 mg、26.80 μmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (1.73 mg、13.49 μmol) を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μm、直径25 mm、長さ100 mm、水 (0.05 % のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は20%~40% であり、溶離時間は12分である)、表題化合物 (1.80 mg) を得た。

30

MS m/z (ESI): 520.1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.34 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.59 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.13–3.89 (m, 1H), 1.95–1.77 (m, 2H), 1.21 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

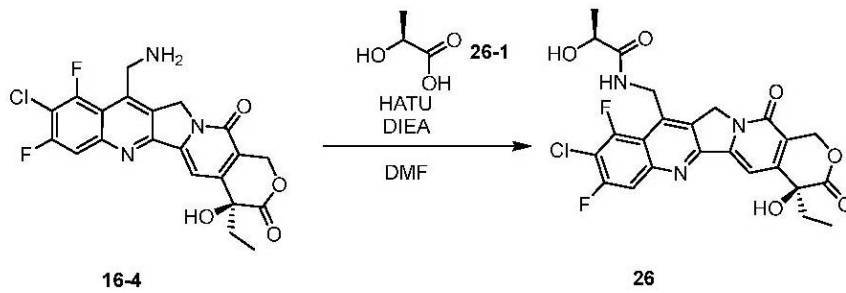
40

【0257】

実施例26、(S)-N-((S)-9-クロロ-4-エチル-8,10-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-3,14-ジオキソ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-11-イル)メチル-2-ヒドロキシプロパンアミド(化合物26)

50

【化 5 2】



10

化合物 16-4 (6 mg、13.40 μmol) 及び中間体 26-1 (2.41 mg、26.80 μmol) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (10.09 mg、26.80 μmol) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.73 mg、13.49 μmol) を加え、反応液を 25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 μm 、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 20% ~ 40% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (1.60 mg) を得た。

20

MS m/z (ESI): 520.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.34 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.23–8.03 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.59 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.07–3.96 (m, 1H), 1.93–1.81 (m, 2H), 1.21 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

【0258】

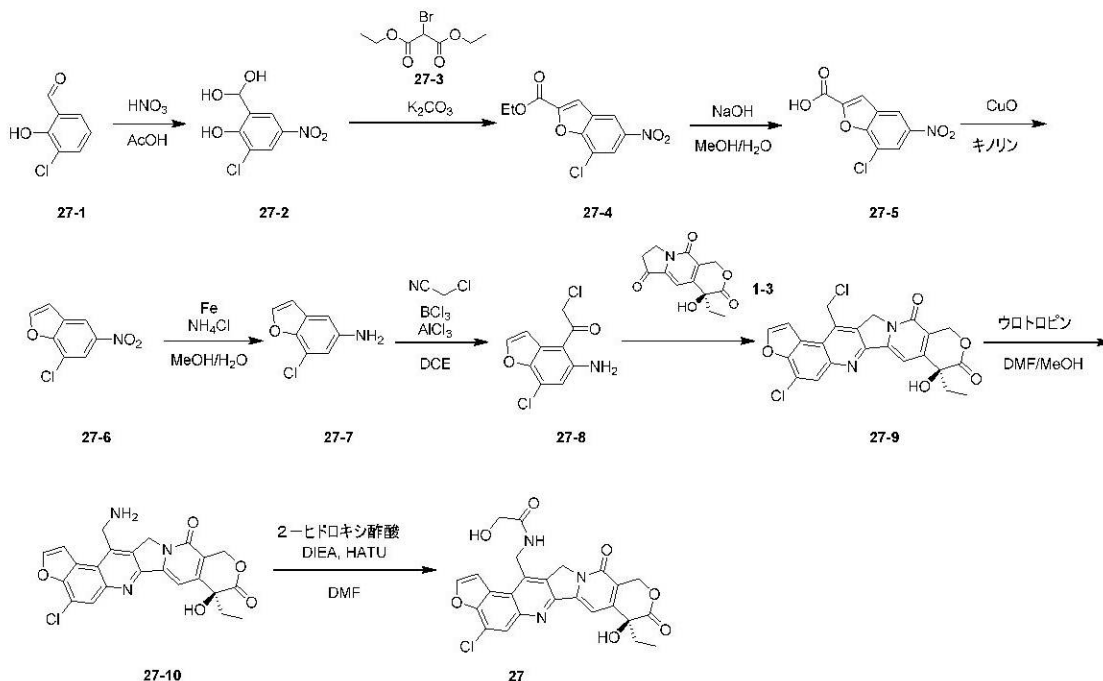
実施例 27、(S)-N-((4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-9, 12-ジオキソ-8, 9, 12, 14-テトラヒドロ-11H-フロ[3, 2-f]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 27)

30

40

50

【化 5 3】



10

20

ステップ 1：（3-クロロ-2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル）メタンジオール（中間体 27-2）の合成

中間体 27-1（6 g）を酢酸（25 mL）に溶解し、反応液を 0℃に降温し、その中に硝酸（9.64 g）をゆっくりと加えた。反応液を 25℃で 4 h 攪拌した。反応終了後、反応液を氷水にゆっくりと滴下した後、酢酸エチル（60 mL）で 3 回抽出し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、減圧下で濃縮乾固して表題化合物（5.88 g）を得た。

^1H NMR（400 MHz, METHANOL- d_4 ） δ = 8.16（d, J = 1.4, 2.4 Hz, 1H）, 8.07–8.01（m, 1H）, 5.68（s, 1H）

30

【0259】

ステップ 2：7-クロロ-5-ニトロベンゾフラン-2-カルボン酸エチル（中間体 27-4）の合成

中間体 27-2（5.88 g）、中間体 27-3（7.69 g）及び炭酸カリウム（7.41 g）をアセトン（60 mL）に溶解し、反応液を 70℃で 6 h 攪拌した。反応終了後、その中に水（50 mL）を加えた後、酢酸エチル（50 mL）で 3 回抽出し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、減圧下で濃縮乾固して表題化合物（4.5 g）を得た。

^1H NMR（400 MHz、クロロホルム- d ） δ = 8.55（d, J = 2.1 Hz, 1H）, 8.39（d, J = 2.1 Hz, 1H）, 7.68（s, 1H）, 4.49（q, J = 7.1 Hz, 2H）, 1.46（t, J = 7.1 Hz, 3H）

40

【0260】

ステップ 3：7-クロロ-5-ニトロベンゾフラン-2-カルボン酸（中間体 27-5）の合成

中間体 27-4（4.5 g）をメタノール（50 mL）に溶解し、その中に水酸化ナトリウム水溶液（2 g in 25 mL の H_2O ）をゆっくりと滴下し、反応液を 25℃で 3 h 攪拌した。反応終了後、その中に水（120 mL）を加えた後、酢酸エチル（50 mL）で 2 回抽出した。水相を希塩酸で pH 1 に調整し、更に酢酸エチル（50 mL）で 3 回抽出し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、減圧下で濃縮乾固して表題化合物（4.0 g）を得た。

50

^1H NMR (400 MHz、クロロホルム- d) δ = 8.45 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H)

【0261】

ステップ4：7-クロロ-5-ニトロベンゾフラン（中間体27-6）の合成

中間体27-5（4 g）及び酸化銅（1.05 g）をキノリン（28 mL）に溶解し、反応液に窒素ガスを流し、200℃で0.5 h 攪拌した。反応終了後、0℃に降温し、その中に希塩酸（80 mL）をゆっくりと滴下した後、水（30 mL）を加え、酢酸エチル（30 mL）で3回抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、減圧下で濃縮乾固して表題化合物（2.4 g）を得た。

^1H NMR (400 MHz、クロロホルム- d) δ = 8.49 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 2.3 Hz, 1H)

10

【0262】

ステップ5：7-クロロベンゾフラン-5-アミン（中間体27-7）の合成

中間体27-6（2.4 g）及び鉄粉（1.55 g）をメタノール（5 mL）に溶解し、その中に塩化アンモニウム水溶液（148.91 mg、5 mL）を滴下し、反応液に窒素ガスを流し、80℃で0.5 h 攪拌した。反応終了後、25℃に降温し、その中に水（10 mL）を加え、酢酸エチル（10 mL）で3回抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、減圧下で濃縮乾固して表題化合物（1.2 g）を得た。

MS m/z (ESI) : 167.8 [M+H] $^+$ 。

20

【0263】

ステップ6：1-（5-アミノ-7-クロロベンゾフラン-4-イル）-2-クロロエタン-1-オン（中間体27-8）の合成

三塩化ホウ素（671.17 mg）を1,2-ジクロロエタン（8 mL）に溶解し、反応液を0℃に降温し、その中に中間体27-7（1.2 g）及びクロロアセトニトリル（702.75 mg）を加え、反応液を0℃で10 min 攪拌し、その中に三塩化アルミニウム（1.24 g）を加えた。その後、反応液を窒素保護下で25℃に昇温して10 min 攪拌した。反応液を窒素保護下で90℃で18 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、氷水（5 mL）及び5%のHCl（1 mL）を順次にゆっくりと加えて25℃で30 min 攪拌し、ジクロロメタン（4 mL）を更に加え、有機相を水（2 mL $\times$ 2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取薄層クロマトグラフィー（シリカ、石油エーテル：（酢酸エチルとエタノールの3/1混合溶媒）= 9：1）に付して、表題化合物（500 mg）を得た。

30

MS m/z (ESI) : 243.8 [M+H] $^+$ 。

【0264】

ステップ7：（S）-4-クロロ-15-（クロロメチル）-8-エチル-8-ヒドロキシ-11, 14-ジヒドロ-12H-フロ[3, 2-f]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-9, 12（8H）-ジオン（中間体27-9）の合成

40

中間体27-8（450 mg）及び中間体1-3（480.35 mg）をトルエン（5 mL）に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム（23.17 mg）を加えた。反応液を90℃で18 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、エタノール（1 mL）を加え、反応液25℃で0.5 h 攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキを石油エーテル（2 mL $\times$ 2）で洗浄し、乾燥させて表題化合物（500 mg）を得た。

MS m/z (ESI) : 471.0 [M+H] $^+$ 。

【0265】

ステップ8：（S）-15-（アミノメチル）-4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-11, 14-ジヒドロ-12H-フロ[3, 2-f]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-9, 12（8H）-ジオン（中間体27-10）の

50

合成

中間体 27-9 (450 mg) をメタノール (1 mL) 及び N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) の混合溶液に溶解し、その中にウロトロピン (267.71 mg) を加えた。反応液を 50℃ で 4 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却し、濃塩酸 (2 mL) を加えて攪拌し、次いで減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 µm、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 13% ~ 43% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (60.0 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 451.9 [M+H]⁺。

10

【0266】

ステップ 9: (S)-N-((4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-9,12-ジオキソ-8,9,12,14-テトラヒドロ-11H-フロ[3,2-f]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 27) の合成

中間体 27-10 (10 mg) 及び 2-ヒドロキシ酢酸 (5.05 mg) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (16.83 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (2.86 mg) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 µm、直径 25 mm、長さ 100 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 28% ~ 48% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (6.0 mg) を得た。

20

MS m/z (ESI): 510.1 [M+H]⁺。

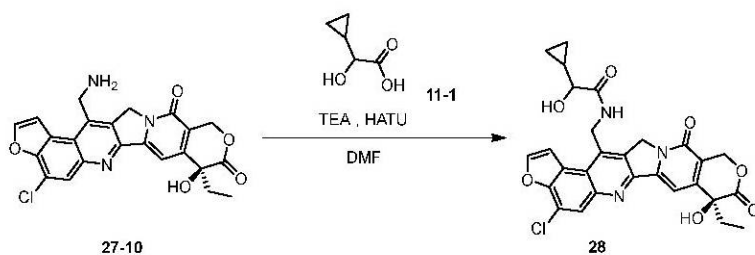
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.46 (s, 2H), 8.36-8.20 (m, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.58 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.49 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.88 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.02-1.75 (m, 2H), 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

30

【0267】

実施例 28、N-((S)-4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-9,12-ジオキソ-8,9,12,14-テトラヒドロ-11H-フロ[3,2-f]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 28)

【化 54】



40

中間体 27-10 (10 mg) 及び中間体 11-1 (8.34 mg) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (13.65 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (3.10 mg) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Waters Xbridge C18 カラム 5 µm、直径

50

25 mm、長さ100 mm、水（0.05%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は34%～54%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（6.2 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 550.1 $[M+H]^+$ 。

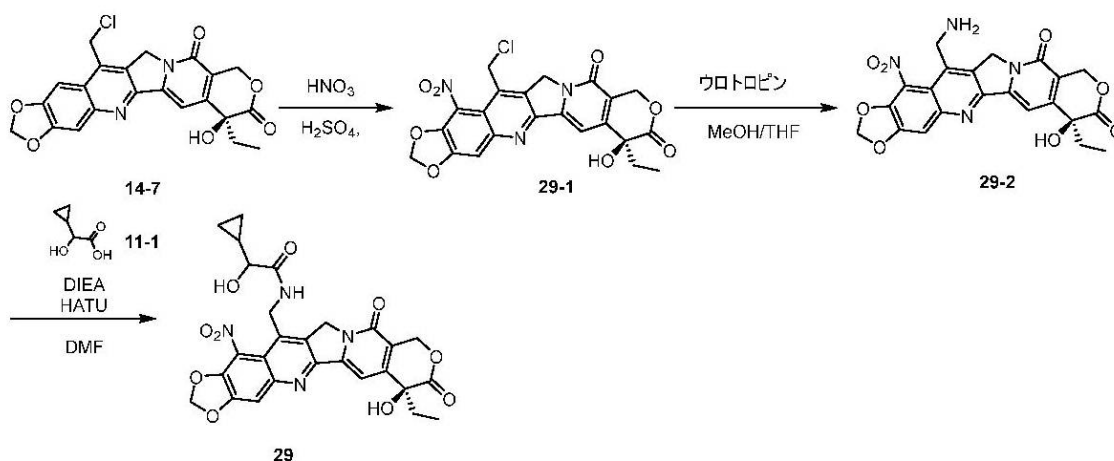
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.48–8.43 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.15–4.98 (m, 2H), 3.57 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 1.95–1.80 (m, 2H), 1.10–1.00 (m, 1H), 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.41–0.32 (m, 2H), 0.32–0.24 (m, 2H)。

10

【0268】

実施例29、2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-15-ニトロ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物29)

【化55】



20

30

ステップ1：(S)-14-(クロロメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-15-ニトロ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン(中間体29-1)の合成

中間体14-7(500.0 mg)を硫酸(15 mL)に溶解し、反応液を0℃に冷却した。更にその中に硝酸(357.35 g、純度70%)をゆっくりと加え、反応液を25℃で1.5 h 攪拌し、反応終了後、氷水(10 mL)を順次にゆっくりと加え、ジクロロメタン(30 mL)を更に加え、有機相を水40 mL(20 mL×2)で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、濾液を減圧下で濃縮乾固して、表題化合物の粗生成物(280.0 mg)を得た。

40

MS m/z (ESI): 486.0 $[M+H]^+$ 。

【0269】

ステップ2：(S)-14-(アミノメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-15-ニトロ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン(中間体29-2)の合成

中間体29-1(270.0 mg)をメタノール(2 mL)及びテトラヒドロフラン(2 mL)に溶解し、その中にウロトロピン(233.73 mg)を加えた。反応液を60℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(YMC-Pack CN C18カ

50

ラム 5 μ m シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.225% の F A を含む) とメタノールの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、メタノールの勾配比は 9% ~ 29% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (15.0 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 467.1 [M+H]⁺。

【0270】

ステップ 3: 2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-15-ニトロ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 29) の合成

中間体 29-2 (12.00 mg) 及び中間体 11-1 (14.94 mg) を無水 N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、その中に HATU (14.67 mg) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (9.98 mg) を加え、反応液を 25 °C で 1.5 h 撹拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Prime C18 カラム 5 μ m シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 15% ~ 45% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (5.20 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 565.2 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.25 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.52 (d, J = 2.6 Hz, 3H), 5.55 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.36 (s, 2H), 4.48 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 3.53 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 1.91-1.83 (m, 2H), 1.10-0.98 (s, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.42-0.28 (m, 4H)。

【0271】

実施例 30、N-((S)-15-クロロ-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 30)

10

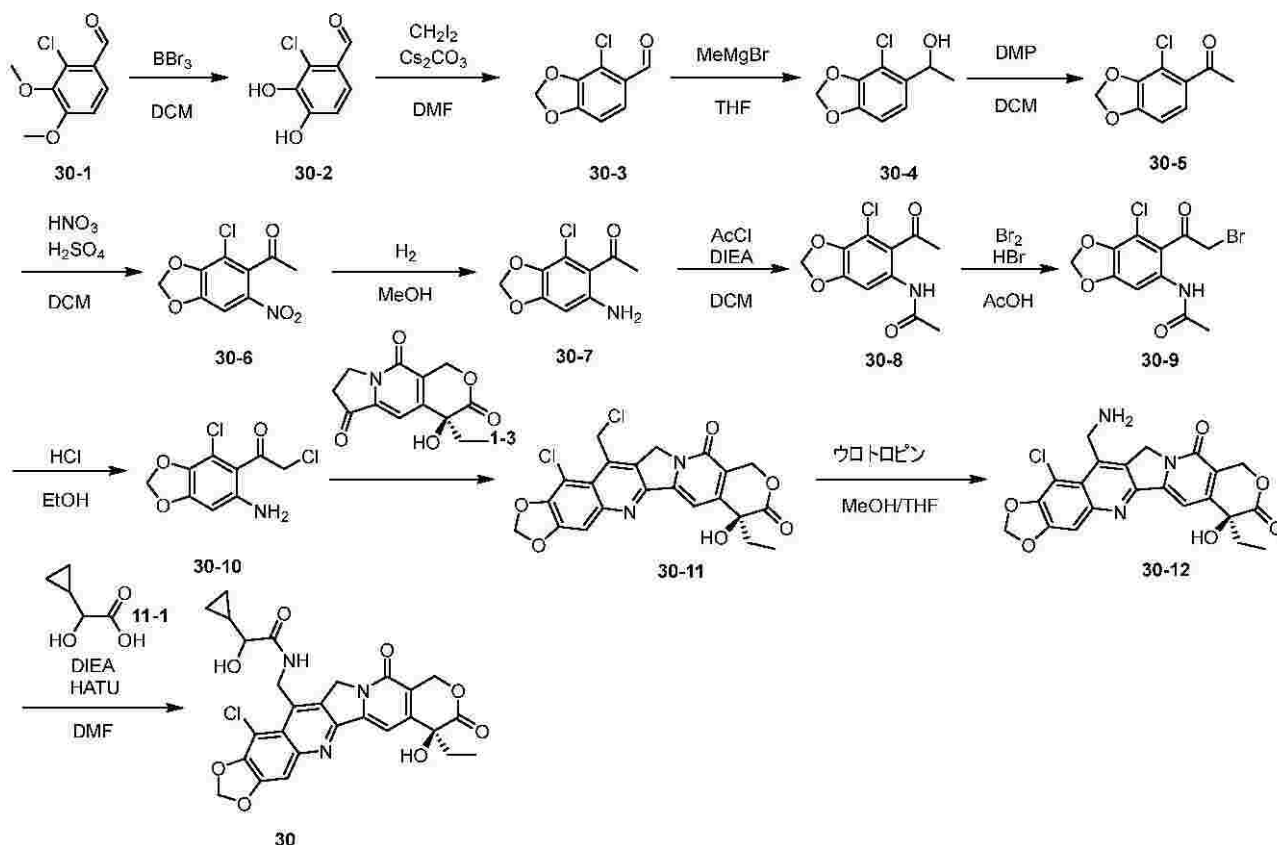
20

30

40

50

【化 5 6】



10

20

30

40

50

ステップ 1：2-クロロ-3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド（中間体 30-2）の合成

中間体 30-1（20.0 g）を無水ジクロロメタン（100 mL）に溶解し、反応液を 0℃に冷却し、その中に三臭化ホウ素（87.41 g）をゆっくりと加え、反応液を 25℃で 4 h 攪拌した。反応終了後、反応液を氷水にゆっくりと注ぎ、酢酸エチル（200 mL）を更に加え、有機相を水（100 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を酢酸エチル：石油エーテル＝1：4 溶液で攪拌洗浄し、濾過して表題化合物（14 g）を得た。

MS m/z (ESI)：173.1 [M+H]⁺。

【0272】

ステップ 2：4-クロロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルバルデヒド（中間体 30-3）の合成

中間体 30-2（10.0 g）を無水 N,N-ジメチルホルムアミド（100 mL）に溶解し、その中に炭酸セシウム（28.32 g）及びジヨードメタン（23.28 g）を加えた。反応液を 100℃で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、水（100 mL）を順次にゆっくりと加え、酢酸エチル（150 mL）を更に加え、有機相を水（50 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固して表題化合物（5.2 g）を得た。

MS m/z (ESI)：185.4 [M+H]⁺。

【0273】

ステップ 3：1-(4-クロロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)エタン-1-オール（中間体 30-4）の合成

中間体 30-3（5.0 g）を無水テトラヒドロフラン（100 mL）に溶解し、反応液を -78℃に冷却し、その中に臭化メチルマグネシウム（4.85 g、3 M）をゆっくりと加えた。反応液を窒素保護下で 25℃で 4 h 攪拌した。反応終了後、水（50 mL）を

順次にゆっくりと加え、酢酸エチル（１００ｍＬ）を更に加え、有機相を水（５０ｍＬ×２）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取カラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝２：１）、表題化合物（５．３ｇ）を得た。

^1H NMR（４００MHz、クロロホルム-*d*） δ ＝６．９９（*d*，*J*＝８．３ Hz，１H），６．６９（*d*，*J*＝８．１ Hz，１H），５．９７（*s*，２H），５．１３（*q*，*J*＝６．４ Hz，１H），１．４１（*d*，*J*＝６．４ Hz，３H）

【０２７４】

ステップ４：１－（４－クロロベンゾ [*d*] [１，３] ジオキソール－５－イル）エタン－１－オン（中間体３０－５）の合成

中間体３０－４（５．２ｇ）を無水ジクロロメタン（１００ｍＬ）に溶解し、反応液を０℃に冷却し、その中にデス・マーチン試薬（DMP）（１６．４９ｇ）をゆっくりと加えた。反応液を窒素保護下で２５℃で２h撹拌した。反応終了後、水（５０ｍＬ）を順次にゆっくりと加え、酢酸エチル（１００ｍＬ）を更に加え、有機相を水（５０ｍＬ×２）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取カラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝３：１）、表題化合物（３．０ｇ）を得た。

MS m/z （ESI）：１９９．２ [*M*＋*H*]⁺。

【０２７５】

ステップ５：１－（４－クロロ－６－ニトロベンゾ [*d*] [１，３] ジオキソール－５－イル）エタン－１－オン（中間体３０－６）の合成

中間体３０－５（２．５０ｇ）を無水ジクロロメタン（２０ｍＬ）に溶解し、その中に濃硫酸（１．２３ｇ）及び硝酸（５．６７ｇ）をゆっくりと加えた。反応液を２５℃で３h撹拌した。反応終了後、反応液を氷水にゆっくりと注ぎ、酢酸エチル（１５０ｍＬ）を更に加え、有機相を水（５０ｍＬ×２）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取カラムクロマトグラフィー（石油エーテル：酢酸エチル＝２：１）に付して、表題化合物（１．８ｇ）を得た。

MS m/z （ESI）：２４４．１ [*M*＋*H*]⁺。

【０２７６】

ステップ６：１－（６－アミノ－４－クロロベンゾ [*d*] [１，３] ジオキソール－５－イル）エタン－１－オン（中間体３０－７）の合成

中間体３０－６（０．８０ｇ）を無水メタノール（６ｍＬ）に溶解し、その中に Raney Ni（４００．０mg）を加えた。反応液を水素雰囲気下で２５℃で１６h撹拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固して表題化合物（５１０．０mg）を得た。

MS m/z （ESI）：２１４．２ [*M*＋*H*]⁺。

【０２７７】

ステップ７：Ｎ－（６－アセチル－７－クロロベンゾ [*d*] [１，３] ジオキソール－５－イル）アセトアミド（中間体３０－８）の合成

中間体３０－７（２６０．０mg）を無水ジクロロメタン（５ｍＬ）に溶解し、反応液を０℃に冷却し、その中に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン（２３５．９５mg）及び塩化アセチル（１４３．３２mg）を加えた。反応液を２５℃で１．５h撹拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取クロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝５：１）、表題化合物（１４０．０mg）を得た。

MS m/z （ESI）：２５６．０ [*M*＋*H*]⁺。

【０２７８】

ステップ８：Ｎ－（６－（２－ブロモアセチル）－７－クロロベンゾ [*d*] [１，３] ジオキソール－５－イル）アセトアミド（中間体３０－９）の合成

中間体３０－８（１１０．００mg）を酢酸（２ｍＬ）に溶解し、その中に臭化水素の酢

10

20

30

40

50

酸溶液（158.24 mg、含有量33%）を加え、更にその中に液体臭素（72.20 mg）をゆっくりと加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を氷水にゆっくりと注ぎ、酢酸エチル（30 mL）を更に加え、有機相を水（20 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮乾固して表題化合物（110.0 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 334.0 [M+H]⁺。

【0279】

ステップ9: 1-(6-アミノ-4-クロロベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イル)-2-クロロエタン-1-オン（中間体30-10）の合成

中間体30-9（110.00 mg）を無水エタノール（1 mL）及び濃塩酸（1 mL）に溶解し、反応液を60℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、氷水（10 mL）及び飽和炭酸水素ナトリウム（10 mL）を順次にゆっくりと加え、ジクロロメタン（30 mL）を更に加え、有機相を水（20 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取薄層クロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル=3:1）、表題化合物（75 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 248.0 [M+H]⁺。

【0280】

ステップ10: (S)-15-クロロ-14-(クロロメチル)-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン（中間体30-11）の合成

中間体30-10（75.00 mg）及び中間体1-3（83.57 mg）をトルエン（3 mL）に溶解し、その中にp-トルエンスルホン酸ピリジニウム（PPTS）（11.4 mg）を加えた。反応液を90℃で16 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、エタノール（1 mL）を加え、反応液25℃で0.5 h 攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール（2 mL×2）で洗浄し、乾燥させて表題化合物（75.0 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 475.1 [M+H]⁺。

【0281】

ステップ11: (S)-14-(アミノメチル)-15-クロロ-7-エチル-7-ヒドロキシ-10,13-ジヒドロ-11H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-8,11(7H)-ジオン（中間体30-12）の合成

中間体30-11（70.00 mg）を無水メタノール（2 mL）及び無水テトラヒドロフラン（1 mL）に溶解し、その中にウロトロピン（61.94 mg）を加えた。反応液を80℃で2 h 攪拌した。反応終了後、反応液を室温に冷却した後、減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し（Boston Prime C18カラム 5 μmシリカ、直径30 mm、長さ150 mm、水（0.225%のギ酸を含む）とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は5%~25%であり、溶離時間は12分である）、表題化合物（16.0 mg）を得た。

MS m/z (ESI): 456.1 [M+H]⁺。

【0282】

ステップ12: N-(((S)-15-クロロ-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキサロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセトアミド（化合物30）の合成

中間体30-12（5.00 mg）及び中間体11-1（6.37 mg）を無水N,N-ジメチルホルムアミド（0.5 mL）に溶解し、その中にHATU（6.26 mg）及び

N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.25 mg) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Prime C18 カラム 5 μm シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.05% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 31% ~ 51% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (2.30 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 554.2 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.78 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.30–6.25 (m, 1H), 6.16 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 5.27–5.21 (m, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.93–4.78 (m, 2H), 3.29 (dd, J = 2.4, 6.1 Hz, 1H), 1.68–1.56 (m, 2H), 0.81–0.72 (m, 1H), 0.63 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.14–0.06 (m, 2H), 0.05–0.03 (m, 2H)。

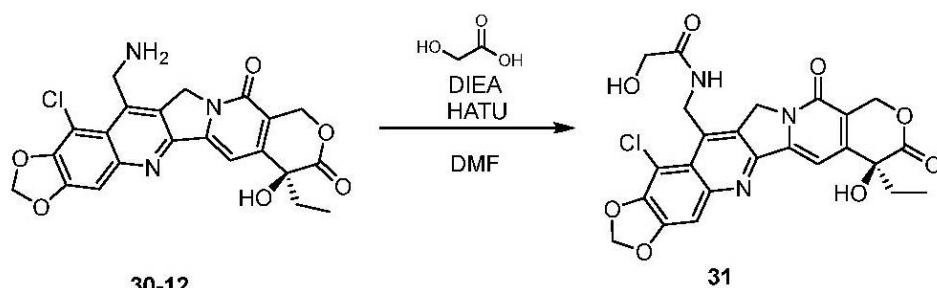
10

【0283】

実施例 31、(S)-N-((15-クロロ-7-エチル-7-ヒドロキシ-8, 11-ジオキソ-7, 8, 11, 13-テトラヒドロ-10H-[1, 3]ジオキソロ[4, 5-g]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 31)

20

【化 57】



中間体 30-12 (5 mg) 及びヒドロキシ酢酸 (4.17 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に HATU (6.26 mg) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.25 mg) を加え、反応液を 25℃ で 1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Prime C18 カラム 5 μm シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 20% ~ 40% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (2.50 mg) を得た。

30

MS m/z (ESI): 514.2 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.03 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.54–6.48 (m, 1H), 6.41 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.12 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.82 (s, 2H), 1.93–1.78 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H)。

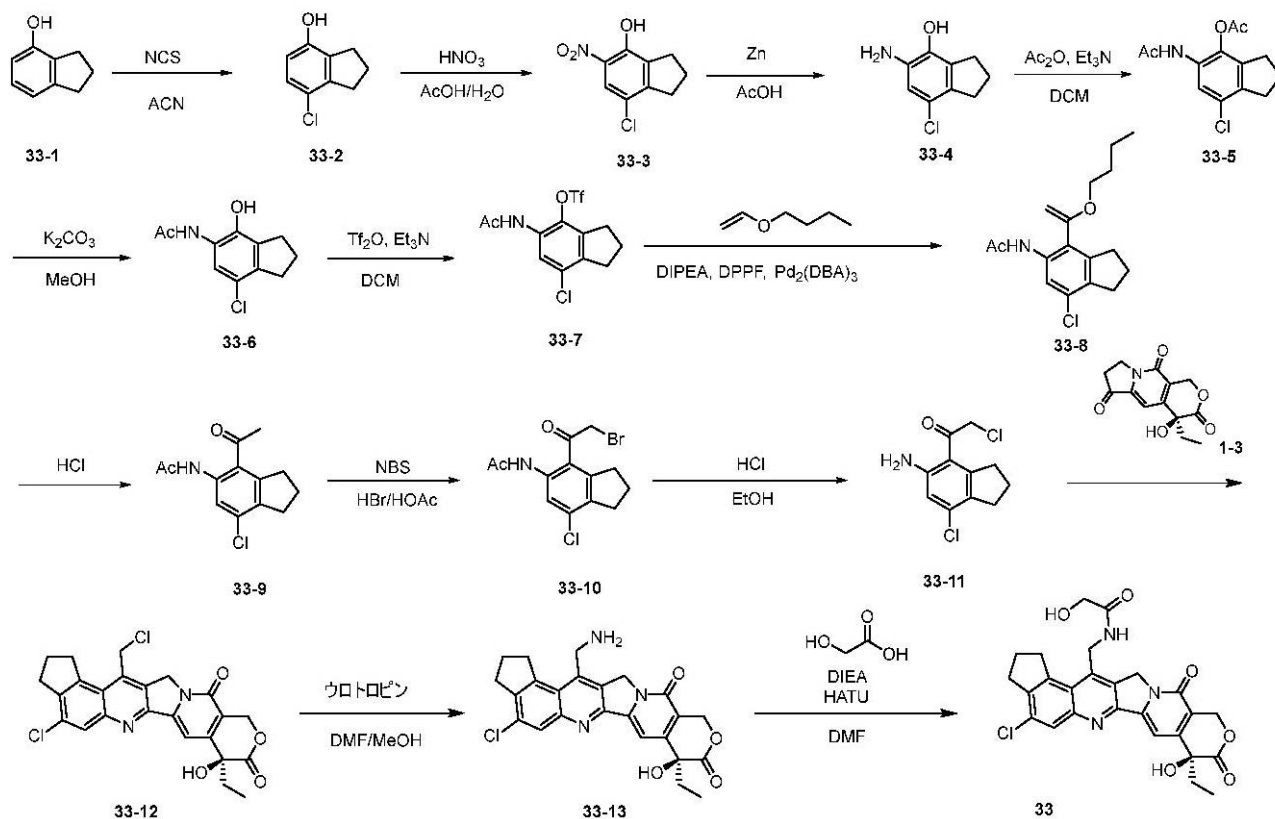
40

【0284】

実施例 33、(S)-N-((4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-9, 12-ジオキソ-2, 3, 8, 9, 12, 14-ヘキサヒドロ-1H, 11H-シクロペンタ[f]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-15-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 33)

50

【化 5 8】



10

20

ステップ 1：7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-オール（中間体 33-2）の合成

中間体 33-1（500 mg）を無水アセトニトリル（5 mL）に溶解し、その中に NCS（547 mg）を加えた後、25℃の条件下で 2 時間攪拌した。反応終了後、反応液に水（10 mL）を加え、酢酸エチル（10 mL × 3 回）で抽出し、有機相を飽和食塩水（30 mL）で洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル＝100：1～10：1）、表題化合物（600 mg）を得た。

30

MS m/z (ESI) : 169.0 [M+H]⁺.

【0285】

ステップ 2：7-クロロ-5-ニトロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-オール（中間体 33-3）の合成

中間体 33-2（10 g）を AcOH（50 mL）及び H₂O（10 mL）に溶解し、0℃でその中に HNO₃（8.62 g、質量分率 65%）を加えた。反応液を 0℃で 2 時間攪拌した。反応終了後、反応液を氷水（200 mL）にゆっくりと加えた。濾過後、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、表題化合物（10 g）を得た。

40

MS m/z (ESI) : 214.0 [M+H]⁺.

【0286】

ステップ 3：5-アミノ-7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-オール（中間体 33-4）の合成

中間体 33-3（5 g）を無水 DCM（50 mL）に溶解し、その中に AcOH（14.04 g）及び Zn（7.61 g）を加え、反応液を 25℃で 12 時間攪拌した。反応終了後、水（200 mL）及び酢酸エチル（200 mL）を順次に加え、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 mL × 2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、表題化合物（4 g）を得た。

50

。

MS m/z (ESI) : 184.0 [M+H]⁺.

【0287】

ステップ4：5-アセトアミド-7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イルアセテート（中間体33-5）の合成

中間体33-4（4 g）を無水ジクロロメタン（40 mL）に溶解し、その中に無水酢酸（Ac₂O）（6.67 g）及びトリエチルアミン（TEA）（6.61 g）を加え、反応液を25℃で12時間攪拌した。反応終了後、水（200 mL）及び酢酸エチル（200 mL）を順次に加え、有機相を飽和NaCl水溶液（50 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル=20：1～5：1）、表題化合物（4 g）を得た。

10

MS m/z (ESI) : 268.0 [M+H]⁺.

【0288】

ステップ5：N-（7-クロロ-4-ヒドロキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル）アセトアミド（中間体33-6）の合成

中間体33-5（4 g）を無水メタノール（20 mL）に溶解し、その中にK₂CO₃（6.19 g）を加え、反応液を25℃で12時間攪拌した。反応終了後、水（200 mL）及び酢酸エチル（200 mL）を順次に加え、有機相を飽和NaCl水溶液（50 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル=20：1～1：1）、表題化合物（2.8 g）を得た。

20

MS m/z (ESI) : 226.0 [M+H]⁺.

【0289】

ステップ6：5-アセトアミド-7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イルトリフルオロメタンスルホナート（中間体33-7）の合成

中間体33-6（500 mg）をジクロロメタン（5 mL）に溶解し、その中にトリフルオロメタンスルホン酸無水物（Tf₂O）（749 mg）及びトリエチルアミン（TEA）（672 mg）を加え、反応液を25℃で12時間攪拌した。反応終了後、水（50 mL）及び酢酸エチル（50 mL）を順次に加え、有機相を飽和NaCl水溶液（50 mL×2）で洗浄し、洗浄後の有機相を適量の無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル=20：1～1：1）、表題化合物（580 mg）を得た。

30

。

MS m/z (ESI) : 358.0 [M+H]⁺.

【0290】

ステップ7：N-（4-（1-ブトキシビニル）-7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル）アセトアミド（中間体33-8）の合成

中間体33-7（430 mg）及びビニル n-ブチルエーテル（360.60 mg）をジオキサン（20 mL）に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）（466 mg）、1,1'-ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン（DPPF）（66 mg）及びトリス（ジベンジリデンアセトン）ジパラジウム（Pd₂（dba）₃）（110 mg）を加え、反応液を80℃で窒素保護下で16時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を水（50 mL）で希釈し、酢酸エチル（50 mL×3回）で抽出し、有機相を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し（石油エーテル：酢酸エチル=20：1～1：1）、表題化合物（300 mg）を得た。

40

MS m/z (ESI) : 308.0 [M+H]⁺.

【0291】

ステップ8：N-（4-アセチル-7-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5

50

－イル) アセトアミド (中間体 33-9) の合成

中間体 33-8 (200 mg) をジオキサン (5 mL) に溶解し、1 N の HCl (5 mL) を加え、25℃で2時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、有機相を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、表題化合物 (150 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 252.0 [M+H]⁺.

【0292】

ステップ 9: N- (4- (2-ブromoアセチル) -7-クロロ-2, 3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル) アセトアミド (中間体 33-10) の合成

中間体 33-9 (300 mg) を HBr / AcOH (4 mL、質量分率 33%) に溶解し、NBS (318.20 mg) を加え、反応液を 25℃で2時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、表題化合物 (390 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 330.0 [M+H]⁺.

【0293】

ステップ 10: 1- (5-アミノ-7-クロロ-2, 3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル) -2-クロロエタン-1-オン (中間体 33-11) の合成

中間体 33-10 (300 mg) を無水エタノールに溶解し、HCl (12 M、8.00 mL) を加え、反応液を 80℃で2時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (クロマトグラフィーカラム: Gemini NX C18 5 μ m $\times$ 10 $\times$ 150 mm、移動相: A: 水 (0.225% のギ酸 v/v)、B: アセトニトリル、B%: 30% ~ 70%)、表題化合物 (64 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 244.0 [M+H]⁺.

【0294】

ステップ 11: (S) -4-クロロ-15- (クロロメチル) -8-エチル-1, 2, 3, 8, 11, 14-ヘキサヒドロ-9H, 12H-シクロペンタ [f] ピラノ [3', 4': 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-9, 12-ジオン (中間体 33-12) の合成

中間体 33-11 (45.00 mg) 及び中間体 1-3 (48.53 mg) をトルエン (1 mL) に溶解し、その中に p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (4.63 mg) を加えた。反応液を 90℃で16 h 攪拌した。反応終了後、室温に冷却し、エタノール (1 mL) を加え、反応液を 25℃で0.5 h 攪拌した。反応液を濾過し、濾過ケーキをエタノール (2 mL $\times$ 2) で洗浄し、乾燥させて表題化合物 (80.0 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 471.1 [M+H]⁺.

【0295】

ステップ 12: (S) -15- (アミノメチル) -4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-1, 2, 3, 8, 11, 14-ヘキサヒドロ-9H, 12H-シクロペンタ [f] ピラノ [3', 4': 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-9, 12-ジオン (中間体 33-13) の合成

中間体 33-12 (40.00 mg) を無水メタノール (1 mL) 及び無水 N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中にウロトロピン (35.69 mg) を加えた。反応液を 50℃で16 h 攪拌した。反応終了後、室温に冷却し、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Prime C18 カラム 5 μ m シリカ、直径 3.0 mm、長さ 150 mm、水 (0.225% の FA を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 35% ~ 55% であり、溶離時間は 12 分である)、表題化合物 (15.0 mg) を得た。

MS m/z (ESI): 452.1 [M+H]⁺.

【0296】

ステップ 13: (S) -N- ((4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-9, 12-

10

20

30

40

50

ジオキソ-2, 3, 8, 9, 12, 14-ヘキサヒドロ-1H, 11H-シクロペンタ [f] ピラノ [3', 4': 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-15-イル) メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 33) の合成

中間体 33-13 (5.00 mg) 及びヒドロキシ酢酸 (4.21 mg、55.30 μ mol) を無水N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中にHATU (6.31 mg) 及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.29 mg) を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Green ODS C18カラム 5 μ mシリカ、直径30 mm、長さ150 mm、水 (0.05%のFAを含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は32%~52%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物 (2.0 mg) を得た。

10

MS m/z (ESI): 510.3 [M+H]⁺.

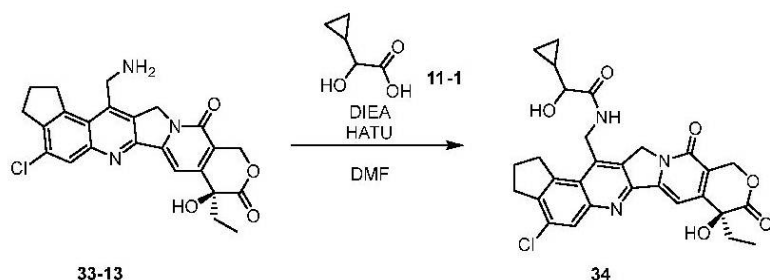
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.36–8.30 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.38 (s, 2H), 4.96 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.74–3.66 (m, 2H), 3.14 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.27–2.19 (m, 2H), 1.92–1.82 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

【0297】

実施例 34、N-((S)-4-クロロ-8-エチル-8-ヒドロキシ-9, 12-ジオキソ-2, 3, 8, 9, 12, 14-ヘキサヒドロ-1H, 11H-シクロペンタ [f] ピラノ [3', 4': 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-15-イル) メチル)-2-シクロプロピル-2-ヒドロキシアセトアミド (化合物 34)

20

【化59】



30

中間体 33-13 (5.00 mg) 及び中間体 11-1 (6.42 mg) を無水N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中にHATU (6.31 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (4.29 mg) を加え、反応液を25℃で1 h 攪拌した。反応終了後、反応液を濾過し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Prime C18カラム 5 μ mシリカ、直径30 mm、長さ150 mm、水 (0.05%のFAを含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は35%~55%であり、溶離時間は12分である)、表題化合物 (2.0 mg) を得た。

40

MS m/z (ESI): 550.3 [M+H]⁺.

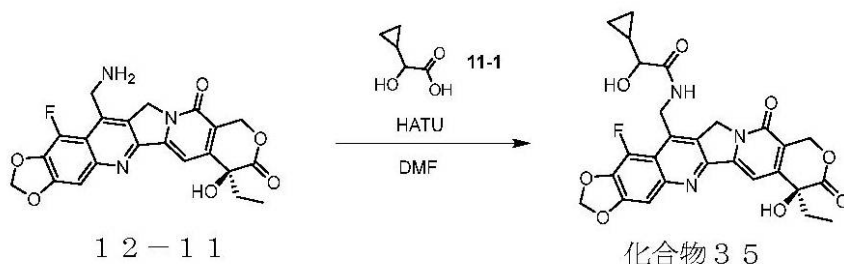
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.36–8.31 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.47–5.41 (m, 3H), 5.38 (s, 2H), 4.96–4.90 (m, 2H), 3.69 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.56 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 3.14 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.27–2.18 (m, 2H), 1.93–1.81 (m, 2H), 1.09–1.03 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.41–0.26 (m, 4H).

【0298】

50

実施例 35、2-シクロプロピル-N-((S)-7-エチル-15-フルオロ-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物35)

【化60】



10

中間体 12-11 (6 mg) 及び中間体 11-1 (7.93 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解し、その中に 2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (7.79 mg) 及び N, N-ジメチルジイソプロピルアミン (5.29 mg) を加え、反応液を 25℃で 1 h 撹拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Prime C18 カラム 5 µm シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する (アセトニトリルの勾配比は 15% ~ 45% であり、溶離時間は 12 分である))、表題化合物 (6.50 mg) を得た。

20

MS m/z (ESI): 538.1 [M+H]⁺。

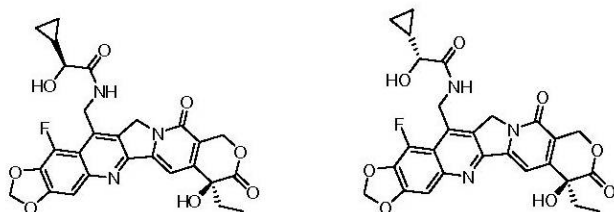
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.21 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.84 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 3.53 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.01 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 0.89-0.85 (m, 3H), 0.33 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 0.30-0.25 (m, 2H)。

30

【0299】

化合物 35-P1 及び 35-P2 の合成

【化61】



40

中間体 12-11 (6 mg) 及び中間体 14-10-P1 (7.93 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、その中に 2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (7.79 mg) 及び N, N-ジメチルジイソプロピルアミン (5.29 mg) を加え、反応液を 25℃で 1 h 撹拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Green ODS C18 カラム 5 µm シリカ、直径 30 mm、長さ 150 mm、水 (0.225% のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は 17% ~ 47% であり、溶離時間は 12 分である)、化合物 35-P1 (2.87 mg) を得

50

た。

MS m/z (ESI) : 538.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.19 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.84 (d, J = 4.6 Hz, 2H), 3.53 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 1.91–1.80 (m, 2H), 1.06–0.97 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.38–0.31 (m, 2H), 0.31–0.24 (m, 2H)。

【0300】

中間体12-11 (6mg) 及び中間体14-10-P2 (4.76mg) をN, N-ジメチルホルムアミド (1mL) に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (10.38mg) 及びN, N-ジメチルジイソプロピルアミン (1.76mg) を加え、反応液を25℃で1h攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し (Boston Green ODS C18カラム 5 μ mシリカ、直径30mm、長さ150mm、水 (0.225%のギ酸を含む) とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用し、アセトニトリルの勾配比は17%~47%であり、溶離時間は12分である)、化合物35-P2 (2.01mg) を得た。

MS m/z (ESI) : 538.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.26–8.16 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.87–4.82 (m, 2H), 3.53 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 1.94–1.80 (m, 2H), 1.05–0.96 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.39–0.30 (m, 2H), 0.31–0.20 (m, 2H)。

【0301】

2つの異性体を、以下のキラル超臨界流体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0302】

【表8】

カラム	Chiralcel OJ-3 100A 4.6mm I. D., 3 μ m
移動相	A : 二酸化炭素
	B : エタノール (0.05%のジエチルアミン)
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 220nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector

【0303】

化合物35-P1 :

上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は3.519分であり、

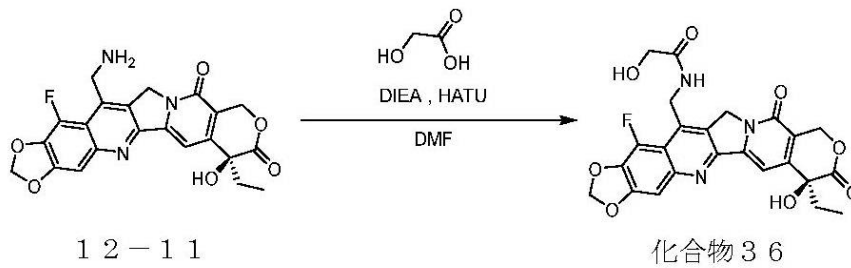
化合物35-P2 :

上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は3.573分であった。

【0304】

実施例36、(S)-N-((7-エチル-15-フルオロ-7-ヒドロキシ-8, 11

ージオキソー7, 8, 11, 13-テトラヒドロ-10H-[1, 3]ジオキソロ[4, 5-g]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-14-イル)メチル)-2-ヒドロキシアセトアミド(化合物36)
【化62】



10

中間体12-11(6mg)及びヒドロキシ酢酸(3.21mg)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(0.5mL)に溶解し、その中に2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(10.38mg)及びジイソプロピルエチルアミン(1.76mg)を加え、反応液を25℃で1h攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を分取高速液体クロマトグラフィーにより精製し(Waters Xbridge C18カラム 5μm、直径25mm、長さ100mm、水(0.05%のギ酸を含む)とアセトニトリルの極性が減少する混合物を溶離液として使用する(アセトニトリルの勾配比は18%~48%であり、溶離時間は12分である))、表題化合物(2.40mg)を得た。

20

MS m/z (ESI): 498.1 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.20 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.39 (s, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.85 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 1.92-1.80 (m, 2H), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

【0305】

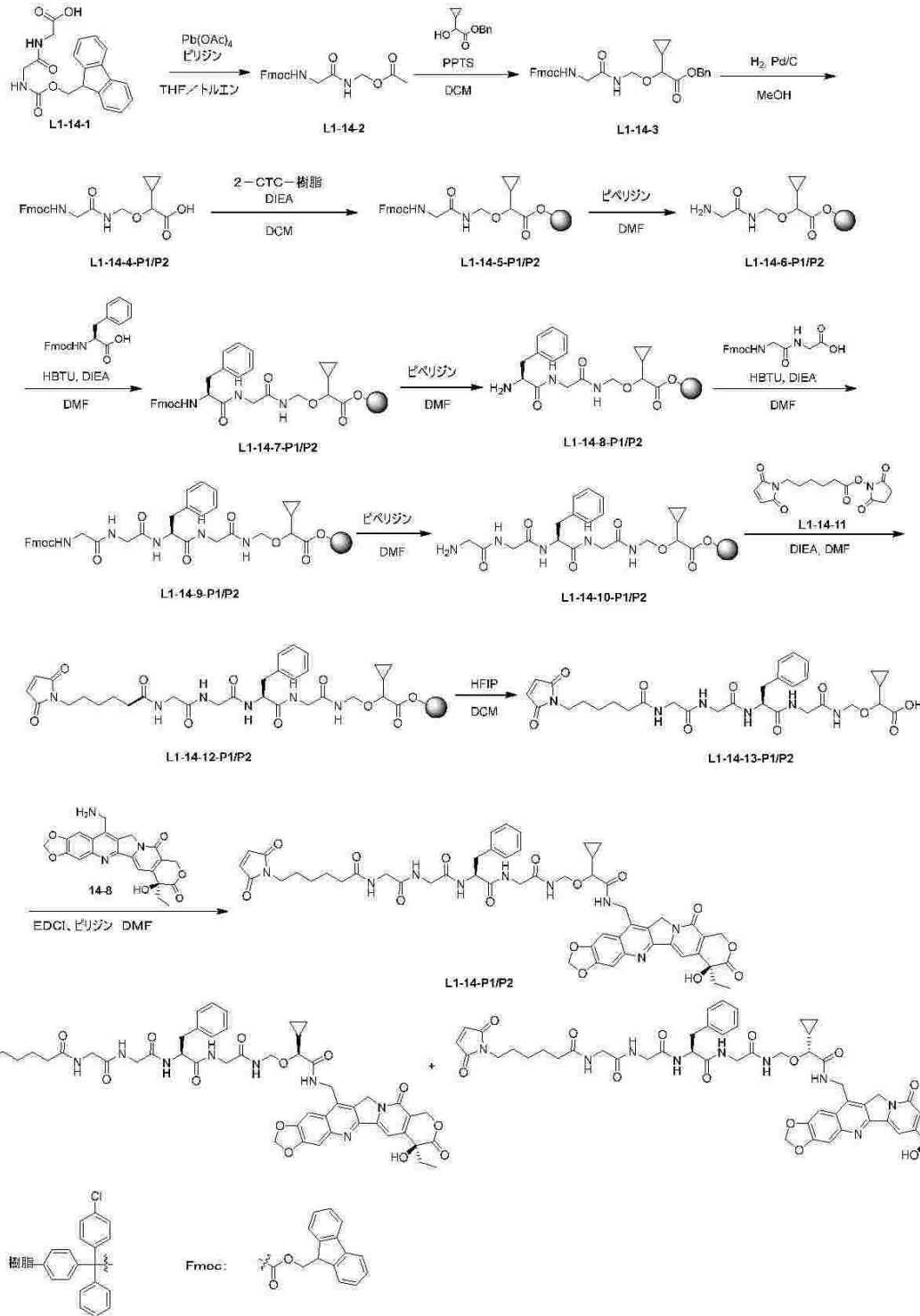
実施例37、N-((12S)-12-ベンジル-4-シクロプロピル-1-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8, 11-ジオキソ-7, 8, 11, 13-テトラヒドロ-10H-[1, 3]ジオキソロ[4, 5-g]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-14-イル)-3, 8, 11, 14, 17-ペンタオキソ-5-オキサ-2, 7, 10, 13, 16-ペンタアザオクタデカン-18-イル)-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサンアミド(化合物L1-14)、異性体L1-14-P1及びL1-14-P2の合成

30

40

50

【化 6 3】



ステップ 1 : 中間体 L 1 - 1 4 - 2 の合成

出発原料 L 1 - 1 4 - 1 (2 5 g)、酢酸鉛 (4 3 . 7 9 g) 及びピリジン (6 . 9 8 g) をテトラヒドロフラン (6 0 0 m L) とトルエン (2 0 0 m L) の混合溶媒に溶解し、窒素雰囲気下で 8 5 ° C に加熱し、1 8 h 攪拌しながら反応させた。反応終了後に室温に冷却し、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製し (カラム : I S C O (R)、3 3 0 g S e p a F l a s h C o l u m n、移動相勾配 0 % ~ 7 5 % 酢酸エチル / 石油エーテル、流速 1 0 0 m L / m i n)、表題化合物 (1 8 g) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (4 0 0 M H z , M E T H A N O L - d ₄) δ = 7 . 8 2 (d , J = 7 . 5

H z, 2 H), 7.69 (d, J = 7.3 Hz, 2 H), 7.44–7.38 (m, 2 H), 7.36–7.31 (m, 2 H), 5.22 (s, 2 H), 4.39 (d, J = 6.8 Hz, 2 H), 4.28–4.22 (m, 1 H), 3.81 (s, 2 H), 2.03 (s, 3 H)。

MS m/z (ESI): 391.1 [M+Na]⁺。

【0306】

ステップ2：中間体 L1-14-3 の合成

中間体 L1-14-2 (5 g)、2-シクロプロピル-2-ヒドロキシ酢酸ベンジル (8.40 g)、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS、341.09 mg) をジクロロメタン (150 mL) に溶解し、反応液を窒素雰囲気下で 65℃ に加熱し、48 h 10 攪拌しながら反応させた。反応終了後、室温に冷却し、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をカラムクロマトグラフィーにより精製し (クロマトグラフィーカラム: ISCO(R)、120 g SepaFlash(R) Silica Flash Column、移動相勾配 0~45% 酢酸エチル/石油エーテル、流速 80 mL/min)、その後、更に高速液体クロマトグラフィーにより精製し (クロマトグラフィーカラム: Boston Prime C18 150×30 mm×5 μm、移動相: [A: 水 (0.225% のギ酸)、B: アセトニトリル]、B%: 42%~82%、13 min)、表題化合物 (1.4 g) を得た。

MS m/z (ESI): 537.2 [M+Na]⁺。

【0307】

ステップ3：中間体 L1-14-4-P1 及び L1-14-4-P2 の合成

中間体 L1-14-3 (1.4 g) を混合溶媒メタノール (15 mL) と水 (15 mL) に溶解し、湿ったパラジウム炭素 (質量含有量 10%、0.15 g) を加え、反応液を水素雰囲気下で 25℃ で 16 h 攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を高速液体クロマトグラフィーにより精製し (クロマトグラフィーカラム: Boston Prime C18 150×30 mm×5 μm、移動相: [A: 水 (0.225% のギ酸)、B: アセトニトリル]、B%: 24%~64%、13 min)、その後、更に超臨界流体クロマトグラフィーにより製造して精製し (クロマトグラフィーカラム: DAICEL CHIRALPAK IC カラム、10 μm シリカ、直径 30 mm、長さ 250 mm、イソプロパノール (0.1% のアンモニア水を含む) を溶離液として使用する)、精製して中間体 L1-14-4-P1 (130 mg) 及び中間体 L1-14-4-P2 (130 mg) を得た。

【0308】

2つの異性体を、以下のキラル高速液体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0309】

キラル高速液体クロマトグラフィー条件は、以下の通りである：

【表 9-1】

クロマトグラフィーカラム	Chiralpak IC-3 100A, 4.6 mm I. D., 3 μm
移動相	A: 二酸化炭素
	B: イソプロパノール (0.05% のジエチルアミン)
流速	2.8 ミリリットル/分

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

波長	PDA 220 nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500 Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

【0310】

中間体 L1-14-4-P1 :

上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は 4.471 分であり、
MS m/z (ESI) : 447.5 [M+Na]⁺。

【0311】

中間体 L1-14-4-P2 :

上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間は 5.692 分であり、
MS m/z (ESI) : 447.3 [M+Na]⁺。

【0312】

ステップ 4 : 中間体 L1-14-5-P1 及び L1-14-5-P2 の合成

2-クロロトリチルクロリド樹脂 (2-CTC-resin) (仕様: 約 1.19 mmol/g) (257 mg) をジクロロメタン (3 mL) に加え、中間体 L1-14-4-P1 (130 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (59.37 mg) を更に加えた。反応液を窒素雰囲気下で 25℃ でシェーカーで 16 h 振とうして反応させた。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて中間体 L1-14-5-P1 (330 mg) を得た。

中間体 L1-14-4-P2 (130 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L1-14-5-P2 (350 mg) を製造した。

【0313】

ステップ 5 : 中間体 L1-14-6-P1 及び L1-14-6-P2 の合成

中間体 L1-14-5-P1 (330 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、ピペリジン (1.08 g) を加えた。反応液を 25℃ でシェーカーに置いて 1 h 振とうした。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて L1-14-6-P1 (220 mg) を得た。

中間体 L1-14-5-P2 (350 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L1-14-6-P2 (220 mg) を製造した。

【0314】

ステップ 6 : 中間体 L1-14-7-P1 及び L1-14-7-P2 の合成

中間体 L1-14-6-P1 (220 mg) 及び ((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル-L-フェニルアラニン (230.17 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、反応液にベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) (225.31 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (99.96 mg) を加えた。反応液を 25℃ でシェーカーに置いて 1 h 振とうした。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて L1-14-7-P1 (377 mg) を得た。

中間体 L1-14-6-P2 (220 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L1-14-7-P2 (361 mg) を製造した。

【0315】

ステップ 7 : 中間体 L1-14-8-P1 及び L1-14-8-P2 の合成

中間体 L 1-14-7-P 1 (377 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、ピペリジン (37.22 mg) を加えた。反応液を 25℃ でシェーカーに置いて 1 h 振とうした。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて L 1-14-8-P 1 (270 mg) を得た。

中間体 L 1-14-7-P 2 (361 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L 1-14-8-P 2 (260 mg) を製造した。

【0316】

ステップ 8：中間体 L 1-14-9-P 1 及び L 1-14-9-P 2 の合成

中間体 L 1-14-8-P 1 (270 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、N-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)グリシルグリシン (209.58 mg) 及びベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (224.29 mg)、ジイソプロピルエチルアミン (99.51 mg) を順次に加えた。反応液を 25℃ でシェーカーに置いて 1 h 振とうした。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて中間体 L 1-14-9-P 1 (403 mg) を得た。

中間体 L 1-14-8-P 2 (260 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L 1-14-9-P 2 (420 mg) を製造した。

【0317】

ステップ 9：中間体 L 1-14-10-P 1 及び L 1-14-10-P 2 の合成

中間体 L 1-14-9-P 1 (403 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、ピペリジン (1.08 g) を加えた。反応液を 25℃ でシェーカーに置いて 1 h 振とうした。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて L 1-14-10-P 1 (300 mg) を得た。

中間体 L 1-14-9-P 2 (420 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L 1-14-10-P 2 (320 mg) を製造した。

【0318】

ステップ 10：中間体 L 1-14-12-P 1 及び L 1-14-12-P 2 の合成

中間体 L 1-14-10-P 1 (300 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、化合物 L 1-14-11 (182.13 mg) 及びジイソプロピルエチルアミン (99.41 mg) を順次に加えた。反応液を 25℃ でシェーカーに置いて 16 h 振とうした。反応終了後、樹脂をメタノール (10 mL) とジクロロメタン (10 mL) で順次に洗浄し、3 回繰り返した。濾過し、濾過ケーキを乾燥させて L 1-14-12-P 1 (374 mg) を得た。

中間体 L 1-14-10-P 2 (320 mg) 及び中間体 L 1-14-11 (194.27 mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L 1-14-12-P 2 (387 mg) を製造した。

【0319】

ステップ 11：中間体 L 1-14-13-P 1 及び L 1-14-13-P 2 の合成

中間体 L 1-14-12-P 1 (374 mg) をジクロロメタン (8 mL) 及びヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP、2 mL) の混合溶媒に加え、反応液を 25℃ でシェーカーで 0.5 h 振とうして反応させた。反応終了後、反応液を濾過して樹脂を除去し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物を高速液体クロマトグラフィーにより精製し (クロマトグラフィーカラム：Boston Prime C18 150×30 mm×5 µm、移動相：[A：水 (0.225% のギ酸)、B：アセトニトリル]、B%：15%～35%、9 min)、中間体 L 1-14-13-P 1 (74 mg) を得た。

¹H NMR (400 MHz, METHANOL-d₄) δ = 7.33–7.20 (m, 5H), 6.81 (s, 2H), 4.77–4.70 (m, 2H), 4.60–4.52

10

20

30

40

50

(m, 1H), 3.96–3.70 (m, 6H), 3.61 (d, J=7.6 Hz, 1H), 3.55–3.47 (m, 2H), 3.27–3.23 (m, 1H), 3.05–2.98 (m, 1H), 2.30 (t, J=7.4 Hz, 2H), 1.72–1.55 (m, 4H), 1.38–1.29 (m, 2H), 1.16–1.07 (m, 1H), 0.60–0.47 (m, 4H).

MS m/z (ESI): 679.7 [M+Na]⁺.

中間体 L1-14-12-P2 (387mg) を原料として、上記方法に従って、中間体 L1-14-13-P2 (86mg) を製造した。

¹H NMR (400MHz, METHANOL-d₄) δ=7.40–7.21 (m, 5H), 6.82 (s, 2H), 4.81–4.67 (m, 2H), 4.60–4.50 (m, 1H), 3.97–3.70 (m, 6H), 3.66–3.57 (m, 1H), 3.56–3.47 (m, 2H), 3.27–3.22 (m, 1H), 3.08–2.97 (m, 1H), 2.35–2.26 (m, 2H), 1.75–1.55 (m, 4H), 1.41–1.32 (m, 2H), 1.16–1.06 (m, 1H), 0.60–0.45 (m, 4H).

MS m/z (ESI): 679.5 [M+Na]⁺.

[0320]

ステップ12: 化合物 L1-14-P1 及び L1-14-P2 の合成

中間体 L1-14-13-P1 (31.17mg)、中間体 14-8 (20mg)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI) (18.20mg)、ピリジン (11.26mg) 及び 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (12.83mg) を N,N-ジメチルホルムアミド (1mL) に溶解し、反応液を窒素雰囲気下で 25℃ で 2h 撹拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより精製し (クロマトグラフィーカラム: Boston Green ODS 150×30mm×5μm、移動相: [A: 水 (0.225% のギ酸)、B: アセトニトリル]、B%: 26%~46%、12min)、化合物 L1-14-P1 (12.3mg) を得た。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.65 (t, J=5.9 Hz, 1H), 8.58 (t, J=6.6 Hz, 1H), 8.27 (t, J=5.6 Hz, 1H), 8.17–8.02 (m, 2H), 7.99 (t, J=5.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.28–7.19 (m, 5H), 7.19–7.14 (m, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.29 (d, J=3.7 Hz, 2H), 5.48–5.37 (m, 4H), 4.85–4.70 (m, 2H), 4.70–4.65 (m, 1H), 4.52–4.45 (m, 1H), 4.43–4.37 (m, 1H), 3.79–3.54 (m, 7H), 3.49 (d, J=7.1 Hz, 1H), 3.08–3.01 (m, 1H), 2.85–2.74 (m, 1H), 2.14–2.06 (m, 2H), 1.94–1.80 (m, 2H), 1.52–1.42 (m, 4H), 1.27–1.13 (m, 2H), 1.01–0.92 (m, 1H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H), 0.41–0.28 (m, 4H).

MS m/z (ESI): 1060.3 [M+H]⁺.

中間体 L1-14-13-P2 (31.17mg) 及び中間体 14-8 (20mg) を原料として、上記方法に従って、化合物 L1-14-P2 (11.4mg) を製造した。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.72–8.52 (m, 2H), 8.33–8.25 (m, 1H), 8.17–7.94 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.32–7.19 (m, 5H), 7.18–7.12 (m, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.35–6.25 (m, 2H), 5.48–5.36 (m, 4H), 4.84–4.59 (m, 3H), 4.54–4.45 (m, 1H), 4.44–4.35 (m, 1H), 3.81–3.54 (m, 7H), 3.49 (d, J=6.7 Hz, 1H), 3.08–3.01 (m, 1H), 2.87–2.73 (m, 1H), 2.14–2.05 (m, 2H), 1.95–1.7

7 (m, 2H), 1.53–1.39 (m, 4H), 1.25–1.13 (m, 2H), 1.03–0.82 (m, 4H), 0.43–0.25 (m, 4H)

MS m/z (ESI): 1060.3 [M+H]⁺.

【0321】

2つの異性体を、以下のキラル高速液体クロマトグラフィーにより更にそれぞれ分析した。

【0322】

キラル高速液体クロマトグラフィー条件は、以下の通りである：

【表10】

クロマトグラフィーカラム	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I. D., 3 μm
移動相	A：二酸化炭素
	B：エタノール（0.05%のジエチルアミン）
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 220nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QD a Detector

10

20

【0323】

化合物L1-14-P1は、上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.735分であった。

【0324】

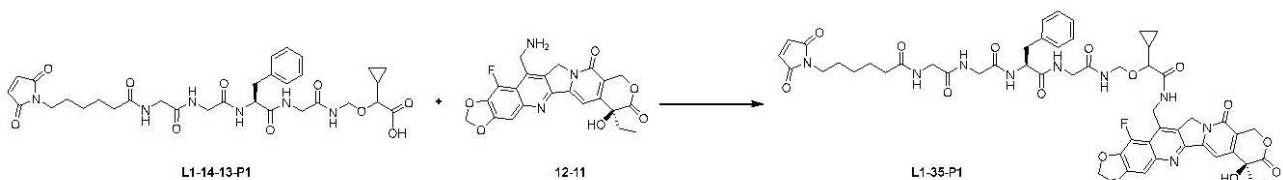
化合物L1-14-P2は、上記キラル高速液体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.901分であった。

【0325】

実施例38：N-((12S)-12-ベンジル-4-シクロプロピル-1-((S)-7-エチル-15-フルオロ-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル)-3,8,11,14,17-ペンタオキソ-5-オキサ-2,7,10,13,16-ペンタアザオクタデカン-18-イル)-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムド（化合物L1-35-P1）

30

【化64】



40

中間体L1-14-13-P1（8mg）、中間体12-11（5.89mg）、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（4.67mg）、ピリジン（2.89mg）及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（3.29mg）をN,N-ジメチルホルムアミド（1mL）に溶解し、反応液を窒素雰囲気下で25℃で2h攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより精製し（カラム：Boston Prime C18 150×30mm×5 μm、移動相：[A：水（0.225%のギ酸）、B：アセトニトリル]、B%：23%～45%、10m

50

i n)、L 1-35-P 1 (2.3 mg) を得た。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.59 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 8.36-8.31 (m, 1H), 8.28 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.14-8.02 (m, 2H), 8.00 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.27-7.16 (m, 6H), 6.99 (s, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.38 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 5.49-5.41 (m, 4H), 4.90-4.82 (m, 2H), 4.69-4.62 (m, 1H), 4.53-4.43 (m, 2H), 3.79-3.54 (m, 7H), 3.47 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.06-3.00 (m, 1H), 2.80-2.74 (m, 1H), 2.10 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.91-1.79 (m, 2H), 1.51-1.41 (m, 4H), 1.22-1.14 (m, 2H), 1.02-0.94 (m, 1H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.40-0.27 (m, 4H)。

10

MS m/z (ESI): 1078.2 $[M+H]^+$ 。

以下の超臨界流体クロマトグラフィーにより更に分析した。

【0326】

超臨界流体クロマトグラフィー条件は、以下の通りである：

【表 11】

カラム	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I. D., 3 μ m	
移動相	A: 二酸化炭素	
	B: エタノール (0.05%のジエチルアミン)	
	時間 (分)	B相%
	0	5
	4	40
	2.5	40
	1.5	5
流速	2.8ミリリットル/分	
波長	PDA 220nm	
カラム温度	35℃	
カラム圧	1500Psi	
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector	

20

30

化合物 L 1-35-P 1 は、上記超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が 3.732 分であった。

【0327】

実施例 39-1: N-((12S)-12-ベンジル-4-シクロプロピル-1-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8,11-ジオキソ-7,8,11,13-テトラヒドロ-10H-[1,3]ジオキソロ[4,5-g]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-14-イル-2,2-d₂)-3,8,11,14,17-ペンタオキソ-5-オキサ-2,7,10,13,16-ペンタアザオクタデカン-18-イル)-6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムイド (化合物 L 1-19-P 1)、異性体 L 1-19-P 2 及びラセミ体 L 1-19 の合成

40

中間体 L 1-14-13-P 1 (7.75 mg)、中間体 19-8 (5.0 mg)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (4.53 mg)、ピリジン (2.80 mg) 及び 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.19 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、反応液を窒素雰囲気下で 25℃で 2 h 攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより精製

50

し（カラム：Boston Green ODS 150×30mm×5μm、移動相：[A：水（0.225%のギ酸）、B：アセトニトリル]、B%：22%～52%、12min）、L1-19-P1（6.0mg）を得た。

MS m/z (ESI)：1062.3 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.74-8.69 (m, 1H), 8.59 (t, J=6.7 Hz, 1H), 8.32-8.26 (t, J=5.6 Hz, 1H), 8.11 (d, J=7.8 Hz, 1H), 8.06 (t, J=5.3 Hz, 1H), 7.99-7.94 (m, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27-7.20 (m, 5H), 7.19-7.11 (m, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.49-5.41 (m, 4H), 4.84-4.72 (m, 2H), 4.71-4.63 (m, 1H), 4.53-4.48 (m, 1H), 4.44-4.36 (m, 1H), 3.77-3.56 (m, 6H), 3.49 (d, J=7.0 Hz, 1H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.83-2.74 (m, 1H), 2.10 (t, J=7.6 Hz, 2H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.50-1.42 (m, 4H), 1.22-1.13 (m, 2H), 1.02-0.90 (s, 1H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H), 0.38-0.29 (m, 4H)。

10

【0328】

中間体L1-14-13-P2（30.0mg）及び中間体19-8（25.2mg）を原料として、上記方法に従って、化合物L1-19-P2（19.0mg）を製造した。

20

MS m/z (ESI)：1062.3 [M+H]⁺。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ=8.73-8.63 (m, 1H), 8.58 (t, J=6.4 Hz, 1H), 8.30 (t, J=5.7 Hz, 1H), 8.13 (d, J=8.1 Hz, 1H), 8.07 (t, J=5.8 Hz, 1H), 8.01 (t, J=5.4 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.28-7.19 (m, 5H), 7.19-7.12 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.48-5.39 (m, 4H), 4.84-4.71 (m, 2H), 4.68-4.55 (m, 1H), 4.53-4.43 (m, 1H), 4.42-4.35 (m, 1H), 3.77-3.54 (m, 6H), 3.49 (d, J=7.0 Hz, 1H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.85-2.76 (m, 1H), 2.09 (t, J=7.5 Hz, 2H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 4H), 1.25-1.12 (m, 2H), 1.02-0.94 (m, 1H), 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H), 0.44-0.24 (m, 4H)。

30

2つの異性体を、以下のキラル高速液体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0329】

キラル高速液体クロマトグラフィー条件は、以下の通りである：

40

50

【表 1 2】

クロマトグラフィーカラム	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I.D., 3 μ m
移動相	A : 二酸化炭素
	B : エタノール (0.05%のジエチルアミン)
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 220nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

10

L1-19-P1は、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.775分であり、

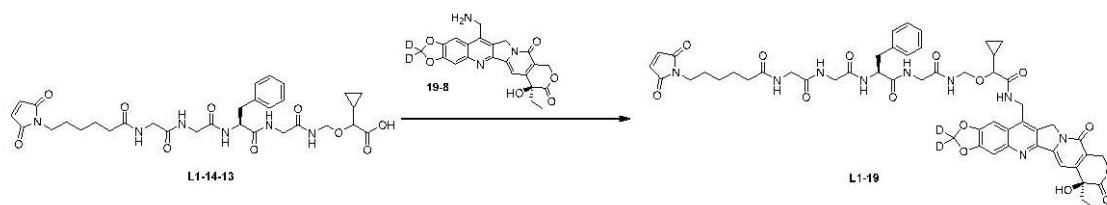
L1-19-P2は、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.973分であった。

【0330】

ラセミ体化合物L1-19の合成

【化65】

20



中間体L1-14-13 (30.00mg、L1-14-13-P1の合成方法を参照して2-シクロプロピル-2-ヒドロキシ酢酸ベンジル (ラセミ体) を原料として合成を行う)、中間体19-8 (25.15mg)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (17.52mg)、ピリジン (10.84mg) 及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (12.35mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (1mL) に溶解し、反応液を窒素保護下で、25℃で2h攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより精製し (カラム: Boston Green ODS 150×30mm×5 μ m、移動相: [A: 水 (ギ酸)、B: アセトニトリル]、B%: 33%~33%、14min)、ラセミ体化合物L1-19 (15.4mg) を得た。

30

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.76–8.66 (m, 1H), 8.59 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 8.36–8.27 (m, 1H), 8.12 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 8.09–8.05 (m, 1H), 8.04–8.00 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.27–7.19 (m, 5H), 7.17–7.12 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 5.49–5.42 (m, 4H), 4.84–4.71 (m, 2H), 4.71–4.63 (m, 1H), 4.53–4.42 (m, 1H), 4.44–4.35 (m, 1H), 3.83–3.54 (m, 6H), 3.49 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 3.08–3.02 (m, 1H), 2.86–2.73 (m, 1H), 2.10 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.93–1.79 (m, 2H), 1.49–1.37 (m, 4H), 1.25–1.13 (m, 2H), 1.01–0.92 (m, 1H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.43–0.25 (m, 4H)。

40

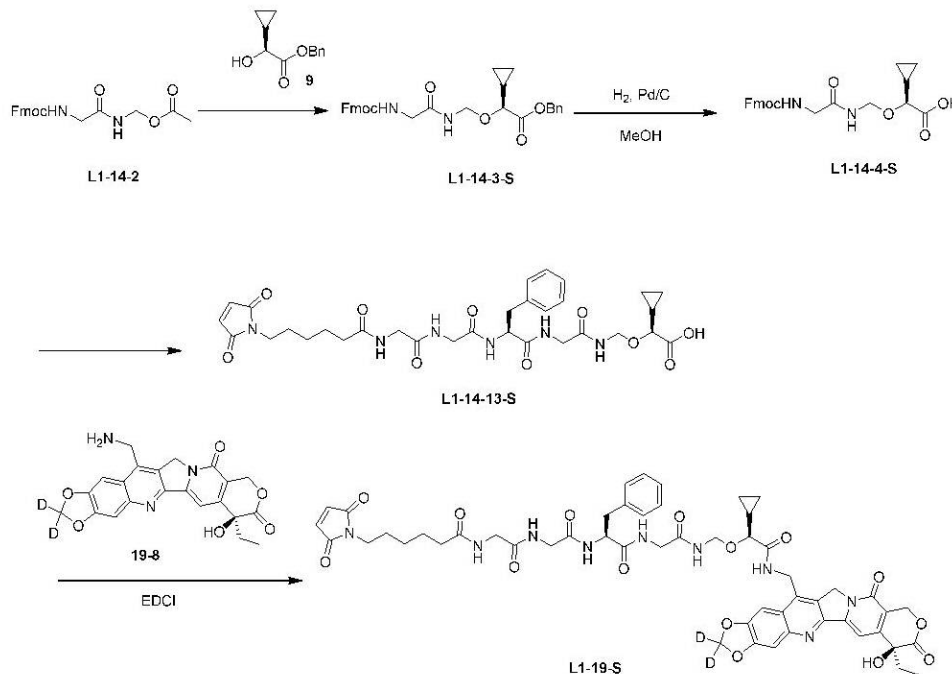
MS m/z (ESI): 1062.4 $[M+H]^+$ 。

50

【0331】

実施例 39-2：N-((4S, 12S)-12-ベンジル-4-シクロプロピル-1-((S)-7-エチル-7-ヒドロキシ-8, 11-ジオキソ-7, 8, 11, 13-テトラヒドロ-10H-[1, 3]ジオキソロ[4, 5-g]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-14-イル-2, 2-d₂)-3, 8, 11, 14, 17-ペンタオキソ-5-オキサ-2, 7, 10, 13, 16-ペンタアザオクタデカン-18-イル)-6-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサナムド(化合物 L1-19-S)

【化66】



ステップ1：L1-14-3-Sの合成

中間体 L1-14-2 (28 g)、中間体 9 (23.5 g、実施例 14-2 により製造される) をジクロロメタン (25 mL) に溶解し、反応液にトリフルオロメタンスルホン酸銀 (139.50 mg) を加え、反応液を窒素保護下で、25℃で108 h 攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物をフラッシュシリカゲルカラムにより精製し(移動相勾配 テトラヒドロフラン/ジクロロメタノール：0~7%、流速 70 mL/min)、表題化合物 (10.3 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 537.3 [M+Na]⁺。

【0332】

ステップ2：L1-14-4-Sの合成

中間体 L1-14-3-S (10 g) をテトラヒドロフラン (100 mL) に溶解し、湿ったパラジウム炭素(質量含有量 10%、1 g) を加え、反応液を 0℃で水素雰囲気中で 16 h 攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を濾過し、濾液を減圧下で濃縮乾固し、残留物に石油エーテル/酢酸エチル (10 mL/0.5 mL) を加えて 2 時間攪拌し、濾過した後、表題化合物 (6 g) を得た。

MS m/z (ESI) : 447.2 [M+Na]⁺。

L1-14-4-S を、以下のキラル高速液体クロマトグラフィー分析法により更にそれぞれ分析した。

【0333】

キラル高速液体クロマトグラフィー条件は、以下の通りである：

10

20

30

40

50

【表 13】

クロマトグラフィーカラム	Chiralpak IC-3 100A, 4.6mm I. D., 3 μ m
移動相	A: 二酸化炭素
	B: イソプロパノール (0.05%のジエチルアミン)
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 220nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

10

【0334】

L1-14-4-Sは、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が4.385分であり、化合物L1-14-4-P1の同じクロマトグラフィー条件下での保持時間(4.471分)と基本的に一致した。従って、L1-14-4-SとL1-14-4-P1の配置は同じであり、同一の化合物であった。

【0335】

ステップ3: L1-19-Sの合成

中間体L1-14-13-S(600mg、L1-14-4-Sを原料として、L1-14-13-P1の合成方法を参照して製造された)、中間体19-8(502.93mg)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDCI)(350.31mg)、ピリジン(216.82mg)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(246.91mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(2mL)に溶解し、反応液を窒素保護下で、25℃で2h攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより精製し(カラム: Boston Green ODS 150×30mm×5 μ m、移動相: [A: 水(0.05%のギ酸)、B: アセトニトリル]、B%: 24%~54%、12min)、表題化合物(286mg)を得た。

20

^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.72-8.63(m, 1H), 8.62-8.52(m, 1H), 8.34-8.26(m, 1H), 8.16-7.94(m, 3H), 7.78(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.26-7.13(m, 6H), 6.99(s, 1H), 6.56-6.42(m, 1H), 5.52-5.40(m, 4H), 4.85-4.60(m, 3H), 4.59-4.46(m, 1H), 4.44-4.38(m, 1H), 3.79-3.53(m, 6H), 3.52-3.44(m, 2H), 3.08-3.02(m, 1H), 2.85-2.75(m, 1H), 2.09(t, J=7.8 Hz, 2H), 1.95-1.75(m, 2H), 1.58-1.38(m, 4H), 1.26-1.09(m, 2H), 1.04-0.96(m, 1H), 0.88(t, J=7.1 Hz, 3H), 0.42-0.26(m, 4H)。MS m/z(ESI): 1062.5 [M+H]⁺。

30

L1-19-Sを、以下のキラル高速液体クロマトグラフィーにより更にそれぞれ分析した。

40

【0336】

キラル高速液体クロマトグラフィー条件は、以下の通りである：

【表 1 4】

クロマトグラフィーカラム	Chiralcel OJ-3 100A, 4.6mm I. D., 3 μ m
移動相	A : 二酸化炭素
	B : エタノール (0.05%のジエチルアミン)
流速	2.8ミリリットル/分
波長	PDA 220nm
カラム温度	35℃
カラム圧	1500Psi
機器型番	Waters UPCC with PDA Detector and QDa Detector

10

【0337】

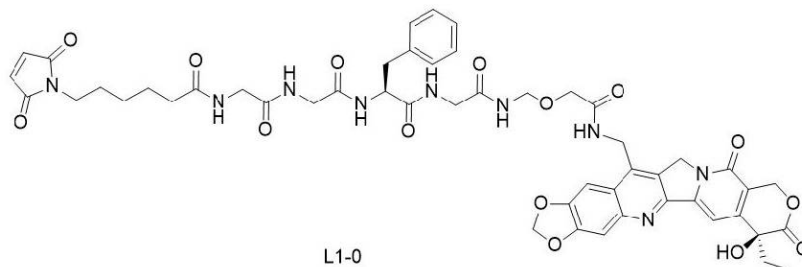
L1-19-Sは、上記キラル超臨界流体クロマトグラフィー条件下で、その保持時間が3.748分であり、実施例39-1で製造された化合物L1-19-P1の同じクロマトグラフィー条件下での保持時間(3.775分)と基本的に一致した。従って、L1-19-SとL1-19-P1は同一配置であり、同じ化合物に属すると判断した。

【0338】

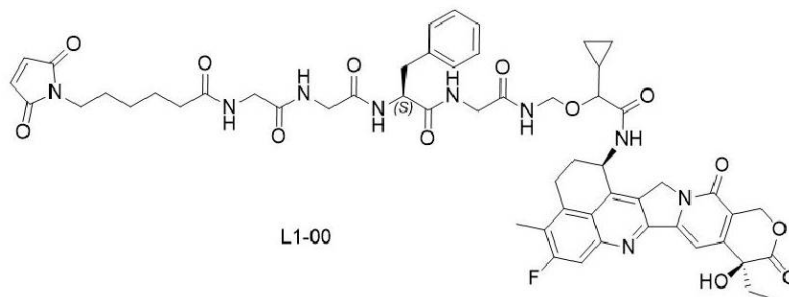
化合物L1-0及びL1-00の合成は、それぞれ、特許文献WO2019195665 A1及びWO2020063676 A1を参照されたい。

20

【化67】



30



40

【0339】

実施例40：抗体-薬物複合体の製造

40.1 抗体：

40.1.1 抗ヒトHER2モノクローナル抗体の構築及び製造

抗ヒトHER2モノクローナル抗体の配列は下記表2に示される通りであり、上記抗体VH及びVLをコードする核酸配列を、シグナルペプチド及び重鎖定常領域／軽鎖定常領域配列を有する発現ベクターpTT5上に組換え、VH-CH1-Fc／VL-CLを発現する組換えプラスミドを得た。配列決定の検証後、プラスミドを抽出し、宿主細胞にトランスフェクトした。培養により、抗体を分泌する細胞培養上清を得た。

【0340】

50

【表 15】

表2 抗ヒトHER2抗体配列情報及びそのCDR分析 (Kabatによる分類)

抗体名称	番号	配列情報	
trastuzumab-VH	SEQ ID NO: 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVTVSS	
trastuzumab-VL	SEQ ID NO: 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKEIK	
pertuzumab-VH	SEQ ID NO: 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD YTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQ RFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLTVTVSS	
pertuzumab-VL	SEQ ID NO: 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIG VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRF SGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQYYI YPYTFGQGTKEIK	
human CH1-Fc	SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPKPCKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTITLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
trastuzumab-VH	DTYIH (SEQ ID NO: 7)	RIYPTNGYTRYA DSVKG (SEQ ID NO: 8)	WGDDGFYAMDY (SEQ ID NO: 9)
trastuzumab-VL	RASQDVNTAVA (SEQ ID NO: 10)	SASFLYS (SEQ ID NO: 11)	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 12)
pertuzumab-VH	DYTMD (SEQ ID NO: 13)	DVNPNSGGSIYN QRFKG (SEQ ID NO: 14)	NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 15)
pertuzumab-VL	KASQDVSI (SEQ ID NO: 16)	SASYRYT (SEQ ID NO: 17)	QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 18)

【0341】

40. 1. 2 抗ヒトp95HER2モノクローナル抗体のスクリーニング

抗ヒトp95HER2モノクローナル抗体は、マウスを免疫することによって産生された。免疫原はhu p95HER2.ECD-Fcタンパク質であり、血清中の抗体価が高く且つ力価が安定する傾向があるマウスの脾臓リンパ球を選択してハイブリドーマ細胞を製造し、ELISA、FACSなどの当技術分野における従来の方法によりスクリーニングして陽性ハイブリドーマクローンを得て、無血清細胞培養法により抗体を更に製造し、且つ抗体を精製し、配列決定した。マウス抗ヒトp95HER2抗体を配列決定により得た。

10

20

30

40

50

【0342】

IMGT (<http://imgt.cines.fr>) ヒト抗体重鎖と軽鎖可変領域生殖細胞系遺伝子データベース及びMOE (Molecular Operating Environment、分子モデリング環境) ソフトウェアの比較により、マウス抗体と相同性の高い重鎖及び軽鎖可変領域生殖細胞系遺伝子をテンプレートとしてそれぞれ選択し、マウス抗体のCDRを、それぞれ、対応するヒトテンプレートに移植し、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序の可変領域配列を形成し、それに基づいて、必要に応じて、元の親和性を確保するために復帰突然変異を行い、及び／又は分子修飾のリスクを排除するためにホットスポット突然変異を行った。最終的に最適化されたヒト化抗体及び対応する配列は表3に示される。

【0343】

【表16】

表3 最適化されたヒト化抗体配列情報及びそのCDR分析 (Kabattによる分類)

抗体名称	番号	配列情報		
P95-H ab01-VH	SEQ ID NO: 19	EVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLYTSG MGVSWIRQPPGKALEWLANIYWDNDKRYNPSLK SRLTISKDTSGNQVVL TMTNMDPVD TATYYCAR SFLYYGN SHWYFDVWGQGTTVTVSS		
P95-H ab01-VL	SEQ ID NO: 20	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMY WYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQYHSYPPTFGQ GTKLEIK		
P95-H ab02-VH	SEQ ID NO: 21	EVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFG LGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWD TAKNFNPVLK SRLTVSKDT SKNQVVL TMTNMDPVD TATYYCVR IGNYGSPYFDYWGQGTTVTVSS		
P95-H ab02-VL	SEQ ID NO: 22	LIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASQSIGTYL AWYQQKPGKAPKLLIYAATSLTDGVP SRFSGSG SGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQVHSSPYSFG GGTKVEIK		
抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3	
P95-H ab01-VH	TSGMGVS (SEQ ID NO: 23)	NIYWDNDKRYNPSL KS (SEQ ID NO: 24)	SFLYYGN SHWYFD V (SEQ ID NO: 25)	
P95-H ab01-VL	SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 26)	RTSNLAS (SEQ ID NO: 27)	QQYHSYPPT (SEQ ID NO: 28)	
P95-H ab02-VH	TFGLGVG (SEQ ID NO: 29)	HIWWD TAKNFNPVL KS (SEQ ID NO: 30)	IGNYGSPYFDY (SEQ ID NO: 31)	
P95-H ab02-VL	LASQSIGTYLA (SEQ ID NO: 32)	AATSLTD (SEQ ID NO: 33)	QQVHSSPYS (SEQ ID NO: 34)	

【0344】

40.1.3 p95HER2/HER2二重特異性抗体の構築及び製造

DVD-Ig形式の抗体は、VH1-linker-VH2-CH1-Fc及びVL1-linker-VL2-CLからなり、そのうち、VH1とVL1はHER2を標的とし、VH2とVL2はp95HER2を標的とし、linkerは省略可能である。二重特異性抗体の具体的な配列は、表4に示される。設計された構造に従い、二重特異性抗体軽鎖と重鎖発現プラスミドをpTT5ベクター上にそれぞれ構築し、且つHEK293細胞

において発現させた。

【0345】

【表17】

表4 p95HER2/HER2二重特異性抗体の配列情報

抗体名称	番号	配列情報
BsAb0 2-P重鎖 全長配列	SEQ ID NO: 35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYT MDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKG RFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARN LGPSFYFDYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLST FGLGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWD TAKNFNPV LKSRLTVSKDTSKNQVVL TMTNMDPVD TATYYC VRIGNYGS PYFDYWGGQTTVT VSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
BsAb0 2-P軽鎖 全長配列	SEQ ID NO: 36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGV AWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSG SGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSLIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCLASQSIGTYLAWYQQKPGKA PKLLIYAATSLTDGVP SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQVHSSPY SFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【0346】

40.1.4 抗ヒトCDH6抗体の構築及び製造

抗ヒトCDH6モノクローナル抗体CDH6-Ab及びCDH6-Ab-1の配列は、下記表5に示される通りである（抗体配列は、US20200171163A1に由来する）。

【0347】

40

50

【表 18】

表5 抗ヒトCDH6抗体CDH6-A b及びCDH6-A b-1配列情報並びにそのCDR分析 (K a b a tによる分類)

抗体名称	番号	配列情報	
CDH6-A b-VH	SEQ ID NO: 37	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT RNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGETEY AQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGVYGGFAGGYFDFWGGGTLVTV SS	
CDH6-A b-VL	SEQ ID NO: 38	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIY KNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPS RFSGSGSGSDFTLTITSSLQPEDFATYFCQQ YYSGWAFGQGGTKVEIK	
CDH6-A b-1-VH	SEQ ID NO: 46	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SHGMHWVRQAPGKGLEWVSVISGSGSNTGY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARQWGSYAFDSWGQGTLLVTVSS	
CDH6-A b-1-VL	SEQ ID NO: 47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAVSTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCQQ SGTFPPTTFGQGGTKVEIK	
human CH1-Fc-1	SEQ ID NO: 39	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	
抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
CDH6-A b-VH	RNFMH (SEQ ID NO: 40)	WIYPGDGETEYA QKFQG (SEQ ID NO: 41)	GVYGGFAGGY FDF (SEQ ID NO: 42)
CDH6-A b-VL	KASQNIYKNL A (SEQ ID NO: 43)	DANTLQT (SEQ ID NO: 44)	QQYYSGWA (SEQ ID NO: 45)
CDH6-A b-1-VH	SHGMH (SEQ ID NO: 48)	VISGSGSNTGYAD SVKG (SEQ ID NO: 49)	QWGSYAFDS (SEQ ID NO: 50)
CDH6-A b-1-VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 51)	AVSTLQS (SEQ ID NO: 52)	QQSGTFPPTT (SEQ ID NO: 53)

【0348】

CDH6-A b-2及びCDH6-A b-3は、マウスを免疫することによって産生された。免疫原はヒトCDH6-hFcタンパク質及びヒトCDH6を過剰発現するHEK293T細胞であり、血清中の抗体価が高いマウスの脾臓リンパ球を選択してハイブリドーマ細胞を製造し、ELISA、FACSなどの当技術分野における従来の方法によりスクリーニングして陽性ハイブリドーマクローンを得て、無血清細胞培養法により抗体を更に製造し、且つ抗体を精製し、配列決定し、マウス由来の抗ヒトCDH6抗体及びその可変領域配列を得た。IMGT (<http://imgt.cines.fr>) ヒト抗体重鎖と軽鎖可変領域生殖細胞系遺伝子データベース及びMOE (Molecular Op

erating Environment) ソフトウェアの比較により、マウス抗体と相
同性の高い重鎖及び軽鎖可変領域生殖細胞系遺伝子をテンプレートとしてそれぞれ選択し
、マウス抗体のCDRを、それぞれ、対応するヒトテンプレートに移植し、FR1-CD
R1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序の可変領域配列を形成し、そ
れに基づいて、必要に応じて、元の親和性を確保するために復帰突然変異を行い、及び／
又は分子修飾のリスクを排除するためにホットスポット突然変異を行った。最終的に最適
化されたヒト化抗体CDH6-Ab-2及びCDH6-Ab-3に対応するVH及びVL
、並びにKabat形式により分類されるCDR配列は表6に示される。

【0349】

【表19-1】

表6 抗ヒトCDH6抗体CDH6-Ab-2及びCDH6-Ab-3配列情報並びに
そのCDR分析 (Kabatによる分類)

抗体名称	番号	配列情報
CDH6-Ab-2-VH	SEQ ID NO: 54	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DNYINWVRQAPGQRLWGMWIYPGTGNSYY NEKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSED TAVYLCASSYGDSDYWGQGTTVTVSS
CDH6-Ab-2-VL	SEQ ID NO: 55	DIIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQDIR NYLNWYQQKPGQTPKLLISYTSRLHSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQ YSQLPWTFGGGTKVEIK
CDH6-Ab-3-VH	SEQ ID NO: 56	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYVMAWVRQAPGQGLEWMGYIFPNSGGTDY SQQFKGRVTLTVDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARELGADYGDYYAMDHWGQGTTVT VSS
CDH6-Ab-3-VL	SEQ ID NO: 57	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASENID SYLAWYQQKPGKSPKLLVYSATLLADGVPS RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQH YYRTFPPTFGGGTKLEIK
human CH 1-Fc-1	SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【表 19-2】

human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC		
抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3	
CDH6-Ab-2-VH	DNYIN (SEQ ID NO: 58)	WIYPGTGNSYYNE KFKG (SEQ ID NO: 59)	SYGDSFDY (SEQ ID NO: 60)	
CDH6-Ab-2-VL	RASQDIRNYLN (SEQ ID NO: 61)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 62)	QQYSQLPWT (SEQ ID NO: 63)	
CDH6-Ab-3-VH	DYYMA (SEQ ID NO: 64)	YIFPNSGGTDYSQ KFKG (SEQ ID NO: 65)	ELGADYGDYYA MDH (SEQ ID NO: 66)	
CDH6-Ab-3-VL	RASENIDSYLA (SEQ ID NO: 67)	SATLLAD (SEQ ID NO: 68)	QHYYRTPPT (SEQ ID NO: 69)	

【0350】

上記抗体VH及びVLをコードする核酸配列を、シグナルペプチド(MGWSWILLFLLSVTAGVHS、配列番号70)及び重鎖定常領域／軽鎖定常領域配列を有する発現ベクターpTT5上に組換え、VH-CH1-Fc／VL-CLを発現する組換えプラスミドを得た。OPTI-MEM(Gibco、製品番号:11058021)にプラスミドとトランスフェクション試薬PEI(Polysciences、製品番号:24765-1)を加え、均一に混合した後に15min静置し、Expi293F細胞(メーカー:ThermoFisher、製品番号:A14527)に加え、5%のCO₂、120rpm、37℃のシェーカーに入れて培養した。トランスフェクションの翌日、OPM-293 ProFeed(Shanghai OPM Biosciences、製品番号:F081918-001)及び6g/Lのグルコース(メーカー:Sigma、製品番号:G7528)を加えた。トランスフェクションの6日目、抗体を分泌する細胞培養上清を得た。

【0351】

40.1.5 抗ヒトLIV-1モノクローナル抗体の構築及び製造

抗ヒトLIV-1モノクローナル抗体LIV1-Ab-1の配列は下記表7に示される通りであり(抗体配列は、US20200165335Aに由来する)、上記抗体VH及びVLをコードする核酸配列を、シグナルペプチド及び重鎖定常領域(配列)／軽鎖定常領域配列を有する発現ベクターpTT5上に組換え、LIV1-Ab-1を発現する組換えプラスミドを得た。配列決定の検証後、プラスミドを抽出した。OPTI-MEM(Gibco、製品番号:11058021)にプラスミドとトランスフェクション試薬PEI(Polysciences、製品番号:24765-1)を加え、均一に混合した後に15min静置し、Expi293細胞(メーカー:ThermoFisher、製品番号:A14527)に加え、5%のCO₂、120rpm、37℃のシェーカーに入れて培養した。トランスフェクションの翌日、OPM-293 ProFeed(Shanghai OPM Biosciences、製品番号:F081918-001)及び6g/Lのグルコース(メーカー:Sigma、製品番号:G7528)を加えた。トランスフェクションの6日目、細胞上清を収集した。

【0352】

【表 20】

表 7 抗ヒトLIV-1抗体配列情報及びそのCDR分析 (Kabatによる分類)

配列名称	番号	配列情報		
LIV1-Ab-1-VH	SEQ ID NO: 71	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIE DYYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT EYGPKEFQGRVTMTDRDTSINTAYMEL SRLRSDDTAVYYCAVHNAHYGTWFA YWGQGTLVTVSS		
LIV1-Ab-1-VL	SEQ ID NO: 72	DVVMTQSPVLSLPVTLGQPASISCRSSQ SLLHSSGNTYLEWYQQRPGQSPRPLIYK ISTRFGVVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTK VEIKR		
human CH1-Fc-2	SEQ ID NO: 73	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVPFI FPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC		
配列名称	CDR1	CDR2	CDR3	
LIV1-Ab-1-VH	DYYMH (SEQ ID NO: 74)	WIDPENGDT EYGPKEF QG (SEQ ID NO: 75)	HNAHYGTWFA Y (SEQ ID NO: 76)	
LIV1-Ab-1-VL	RSSQSLL HSSGNTYLE (SEQ ID NO: 77)	KISTRFS (SEQ ID NO: 78)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 79)	

【0353】

40. 1. 6 抗ヒトROR1モノクローナル抗体の構築及び製造

抗ヒトROR1モノクローナル抗体ROR1-Ab-1可変領域配列は、特許WO2020198531A2に由来するものであり、ROR1-Ab-2可変領域配列は、特許CN113521300Aに由来するものであり、且つROR1-Ab-3可変領域配列は、特許WO2020074724A1に由来するものである（表8を参照する）。上記抗体VH及びVLをコードする核酸配列を、ヒトIgG1のCH及びCLを有するpTT59発現ベクターに組換え、ROR1-Ab-1、ROR1-Ab-2及びROR1-Ab-3を発現する組換えプラスミドをそれぞれ得た。

【0354】

OPTI-MEM (Gibco、製品番号: 11058021) にプラスミドとトランスフェクション試薬PEI (Polysciences、24765-1) を加え、均一に混合した後に15min静置し、Expi293細胞 (ThermoFisher、A14527) に加え、5%のCO₂、120rpm、37℃のシェーカーに入れて培養した。トランスフェクションの翌日、OPM-293 ProFeed (Shanghai OPM Biosciences、F081918-001) 及び6g/Lのグルコース (Sigma、G7528) を加えた。トランスフェクションの6日目、細胞上清を収集

した。

【 0 3 5 5 】

【 表 2 1 - 1 】

表8 抗ヒトROR1抗体配列情報及びそのCDR分析 (K a b a tによる分類)

配列名称	配列番号	アミノ酸配列
ROR1-Ab-1-VH	(SEQ ID NO: 80)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGY AFTAYNIHWVRQAPGQGLEWMGSFDPY DGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDATATYYCARGWYYFDYWGH GTLVTVSS
ROR1-Ab-1-VL	(SEQ ID NO: 81)	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRASK SISKYLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTL QSGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESE DAAYYFCQQHDESPYTFGEGTKVEIK
ROR1-Ab-2-VH	(SEQ ID NO: 82)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSI SHN SGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKFISARKSLGR SYSNGMDVWGQGTLLVTVSS
ROR1-Ab-2-VL	(SEQ ID NO: 83)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSS NIGSNDVTWYQQLPGTAPKLLIYADSK RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCGTWDYSLSGYVFGGGTKLTVL
ROR1-Ab-3-VH	(SEQ ID NO: 84)	QVQLRESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGF DISSYYMSWVRQPPGKGLEWIGAIGIS GNAYYASWAKSRVTISRDT SKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDHPTYGMDLWG PGTLVTVSS
ROR1-Ab-3-VL	(SEQ ID NO: 85)	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCEGNNI GSKAVHWYQQKPGQAPVLVIYDDDERP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDSSAYVFGGGTKLTVL
human CH1-Fc	SEQ ID NO: 5	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
human CL	SEQ ID NO: 6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

配列名称	CDR 1	CDR 2	CDR 3
ROR1-Ab-1-VH	AYNIH (SEQ ID NO: 86)	SFDPYDGGSSYNQ KFKD (SEQ ID NO: 87)	GWYYFDY (SEQ ID NO: 88)
ROR1-Ab-1-VL	RASKSISK YLA (SEQ ID NO: 89)	SGSTLQS (SEQ ID NO: 90)	QQHDESPYT (SEQ ID NO: 91)
ROR1-Ab-2-VH	NYAMS (SEQ ID NO: 92)	SISHNSGSTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 93)	FISARKSLGRSYS NGMDV (SEQ ID NO: 94)
ROR1-Ab-2-VL	TGSSSNIG SNDVT (SEQ ID NO: 95)	ADSKRPS (SEQ ID NO: 96)	GTWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 97)
ROR1-Ab-3-VH	SYYMS (SEQ ID NO: 98)	AIGISGNAYYASW AKS (SEQ ID NO: 99)	DHPTYGMDL (SEQ ID NO: 100)
ROR1-Ab-3-VL	EGNNIGSK AVH (SEQ ID NO: 101)	DDDERPS (SEQ ID NO: 102)	QVWDSSAYV (SEQ ID NO: 103)

【0356】

40.2 抗体精製：Protein Aアフィニティークロマトグラフィーを利用し、細胞培養上清から上記抗体を精製した。Protein Aアフィニティカラムに対して6Mの塩酸グアニジンでカラム体積の3～5倍を洗浄した後、純水でカラム体積の3～5倍を洗浄した。例えば、1×PBS (pH 7.4) 緩衝系を平衡緩衝液として利用し、クロマトグラフィーカラムに対して3～5倍のカラム体積を平衡した。細胞上清を低流速でローディングして結合し、保持時間が約1min又はそれ以上になるように流速を制御し、結合完了後、紫外線吸収がベースラインに戻るまで、クロマトグラフィーカラムの3～5倍カラム体積を1×PBS (pH 7.4) で洗浄した。0.1Mの酢酸／酢酸ナトリウム (pH 3.0～3.5) 緩衝液を用いてサンプルを溶離し、紫外線モニタリングにより溶離ピークを収集し、溶離生成物を1MのTris-HCl (pH 8.0) を用いてpHを5～6に迅速に調整して一時保存した。溶離生成物に対して、当業者に周知の方法を利用して溶液置換を行うことができ、例えば限外濾過管を利用して限外濾過して濃縮し、且つ溶液を所望の緩衝系に置換するか、又はG-25脱塩などの分子排除を利用して所望の緩衝系に置換するか、又はSuperdex 200などの高分解能分子排除カラムを利用して溶離生成物中の多量体成分を除去してサンプルの純度を向上させる。精製後に純度要件を満たすタンパク質を、透析して液交換し、そして後続のカップリング及び検出を行った。

【0357】

40.3 カップリング：上記抗体を、限外濾過管Amicon-Ultra-30kDに加え、50mMのリン酸塩、150mMのNaCl、1mMのEDTA、pH 6.5の緩衝液に濃縮、液交換し、抗体溶液に7～8倍の10mMのトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン溶液（TCEP）を加え、混合溶液に対して25℃で恒温金属シェーカーにて抗体を2～3h還元した。15～20倍（DMSO溶解）の対応する薬物-リンカー

化合物（実施例 37～39 により製造され、又は実施例 37～39 の方法を参照して製造される）を反応系に加え、反応液を 25℃で 2～16 h カップリングさせた。反応生成物を限外濾過してリン酸塩（PBS）緩衝液に濃縮、液交換し、未反応の遊離小分子毒素を除去した。SEC 及び LC-MS 法を用いて、ADC 生成物に対して純度及び DAR 値分析を行った。

【0358】

40.4 SEC 純度分析：SEC-HPLC 法を用いて被験タンパク質サンプルを分析し、組換えタンパク質の分子サイズの均一性を特徴付け、組換えタンパク質の純度を測定した。この方法に用いられる HPLC は Agilent 1260 であり、クロマトグラフィーカラムは TSK gel G3000SWXL (Tosoh Bioscience から購入) であり、移動相は 200 mM のリン酸緩衝液であり、pH 7.0 / イソプロパノール (v/v 9:1) であり、検出温度は 25℃であり、流速は 0.5 mL/min であり、検出波長は 280 nm であり、標的タンパク質のローディング量は 50 µg であり、分析時間は 40 min であった。

【0359】

40.5 DAR 値測定：超高速液体クロマトグラフィー質量分析 (UHPLC-MS) 併用法を用いて、ADC 分子の DAR 値を測定した。まず、被験 ADC 分子を PNGase F で処理し、N 糖修飾を除去し、更にジチオトレイトール (Dithiothreitol, DTT) で処理し、37℃で 1 h インキュベートし、軽鎖と重鎖に還元し、次いで Thermo Vanquish UHPLC-Q Exactive Plus 質量分析システムで分析し、2 µg のタンパク質を取って Waters ACQUITY Protein BEH サイズ排除クロマトグラフィーカラムに注射し、移動相は 0.1 % のギ酸、0.05 % の TFA、25 % のアセトニトリルを含む水溶液であり、流速は 0.2 mL/min であり、分析時間は 30 min であり、質量分析計は Thermo Q Exactive Plus であり、質量分析の主なパラメータはそれぞれスプレー電圧 3.8 kV、キャピラリー加熱温度 300℃、シースガス流速 35 arb、親イオンスキャン範囲 800～3000 などであり、最後に、質量分析データ分析ソフトウェア Biopharma Finder 4.1 を用いて、Respect アルゴリズムによってデコンボリューション処理し、軽鎖と重鎖の質量分析ピークの分子量情報及び各成分の質量分析応答信号をそれぞれ計算し、それにより、被験 ADC サンプルの DAR 値を算出した。

【0360】

上記と同様の方法でアイソタイプ対照抗体 Ab-ISO (anti-FITC-hIgG1 抗体) を製造し、且つ Linker+Payload 化合物とカップリングさせ、対応する ADC のアイソタイプ対照を得た。

【0361】

上記と同様の方法で、抗体 ROR1-Ab-1、ROR1-Ab-2 及び ROR1-Ab-3 をそれぞれ化合物 L1-0 とカップリングさせ、ADC-L1-0-8、ADC-L1-0-9、ADC-L1-0-10 を製造し、DAR 値はそれぞれ 6.6、5.5、7.5 であり、抗体 LIV1-Ab-1 を化合物 L1-0 とカップリングさせ、ADC-L1-0-7 を得、DAR 値は 6.7 であり、抗体 trastuzumab、pertuzumab をそれぞれ化合物 L1-00 とカップリングさせ、ADC-L1-00-2 及び ADC-L1-00-11 を得、DAR 値はそれぞれ 6.8 及び 7.3 であり、抗体 trastuzumab、pertuzumab をそれぞれ化合物 L1-0 とカップリングさせ、ADC-L1-0-2 及び ADC-L1-0-11 を得、DAR 値は何れも 7.3 であり、抗体 CDH6-Ab、CDH6-Ab-2、CDH6-Ab-3 をそれぞれ化合物 L1-0 とカップリングさせ、ADC-L1-0-3、ADC-L1-0-5 及び ADC-L1-0-6 を得、DAR 値はそれぞれ 7.4、7.4 及び 7.2 であった。

【0362】

10

20

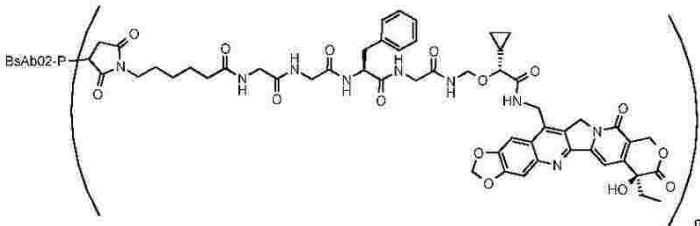
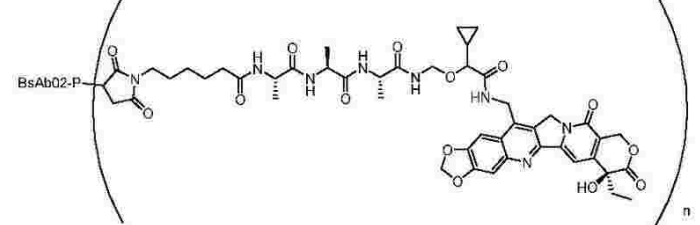
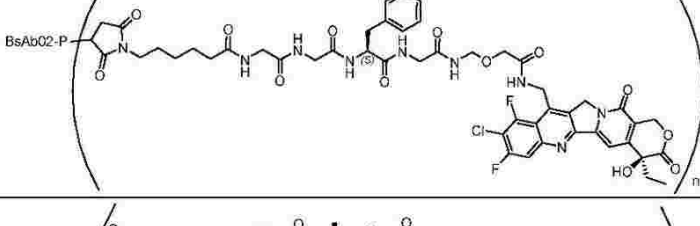
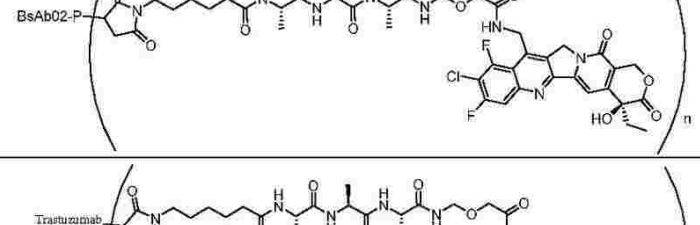
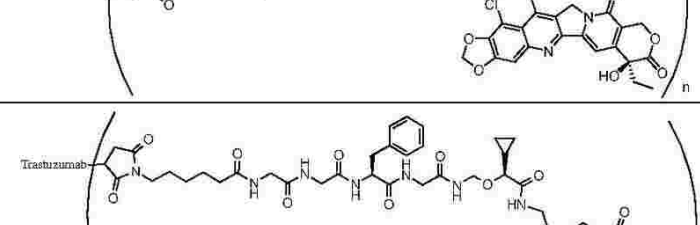
30

40

50

【表 2 2 - 1】

表 9 抗体-薬物複合体、そのDAR値及びSEC純度

複合体番号	ADC構造	DAR	SEC純度 (モノマー%)
ADC-L1-14-P2-1		8.0	95.7
ADC-L2-14-P2-1		8.4	97.0
ADC-L1-21-1		7.6	94.3
ADC-L2-21-1		6.7	92.3
ADC-L2-31-2		7.4	91.4
ADC-L1-14-P1-2		7.0	90.1

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

ADC-L1-14-P2-2		7.4	83.7
ADC-L1-14-P1-3		8.5	93.1
ADC-L1-35-P1-3		8.0	93.1
ADC-L1-19-P1-3		7.2	93.7
ADC-DS		7.5	92.8 3
ADC-L1-19-P1-4		6.9	95.2 5
ADC-L1-19-P1-5		8.2	96.0 3

10

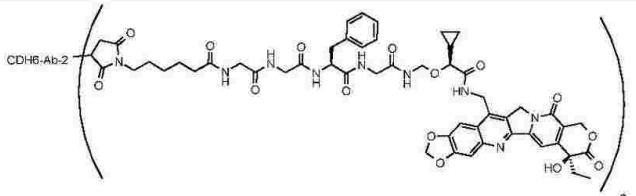
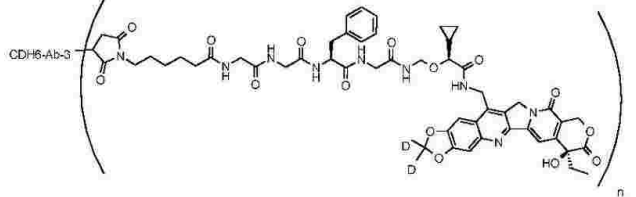
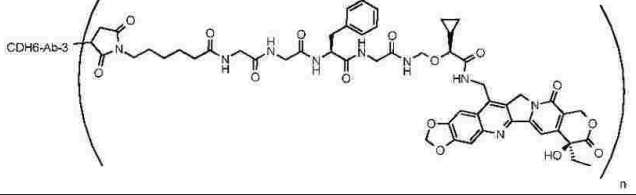
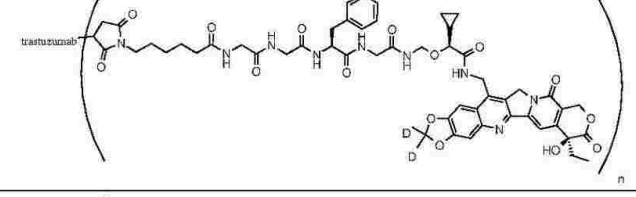
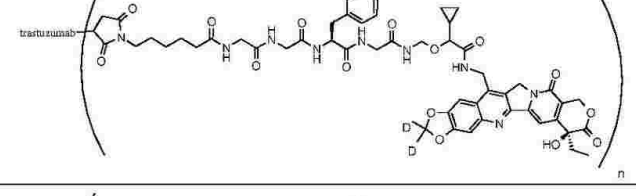
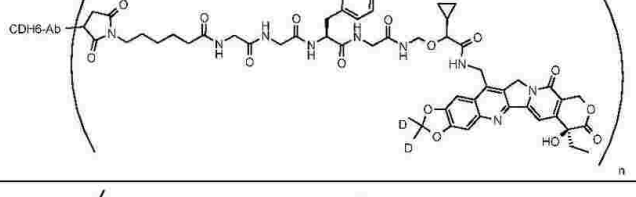
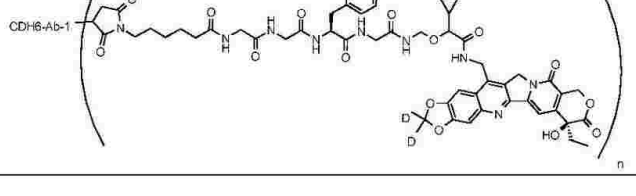
20

30

40

50

【表 2 2 - 3】

ADC-L1- 14-P1-5		7.8	97.0 5
ADC-L1- 19-P1-6		8.0	92.8 6
ADC-L1- 14-P1-6		7.6	92.8 9
ADC-L1- 19-P1-2		7.6	83.3 3
ADC-L1- 19-2		7.0	88.3
ADC-L1- 19-3		7.1	94.0 9
ADC-L1- 19-4		6.3	94.2 5

10

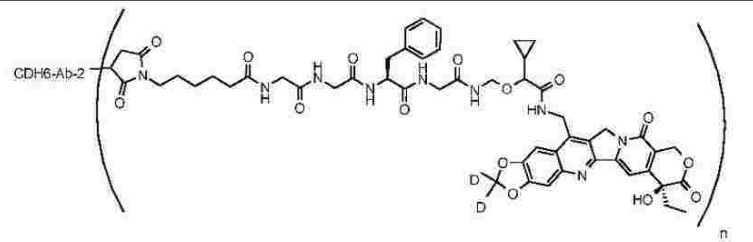
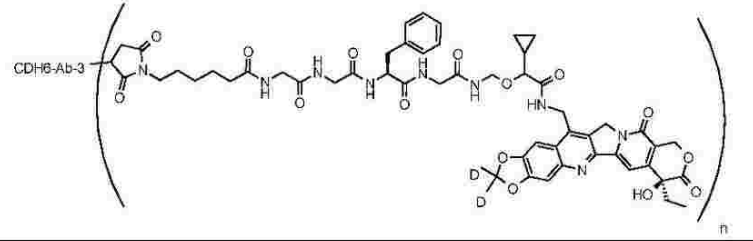
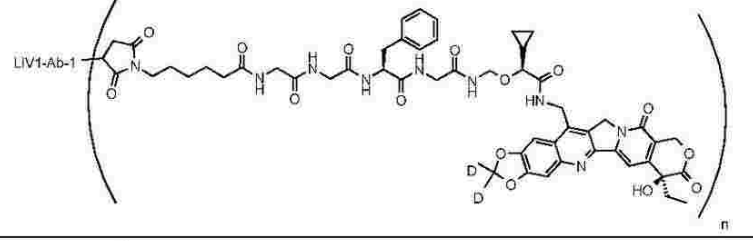
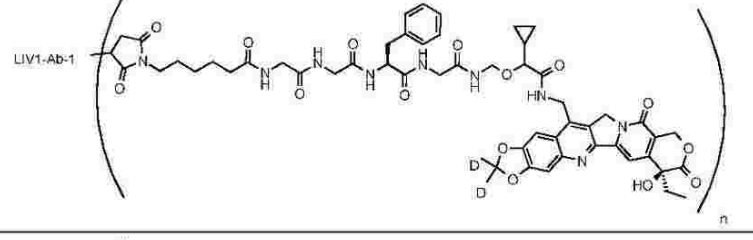
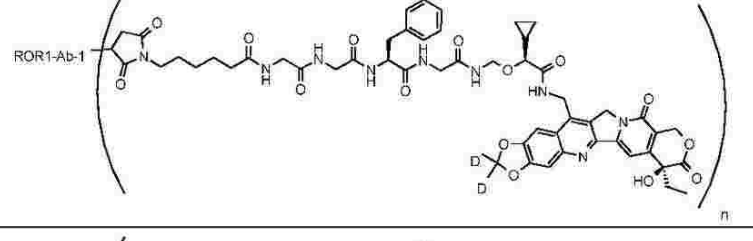
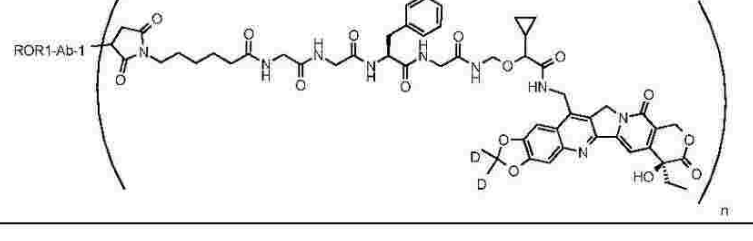
20

30

40

50

【表 2 2 - 4】

ADC-L1- 19-5		6.8	93.9 5
ADC-L1- 19-6		7.4	91.9 2
ADC-L1- 19-P1-7		8.3	95.2
ADC-L1- 19-7		6.5	90.1
ADC-L1- 19-P1-8		7.7	93.7
ADC-L1- 19-8		7.1	91.3 8

10

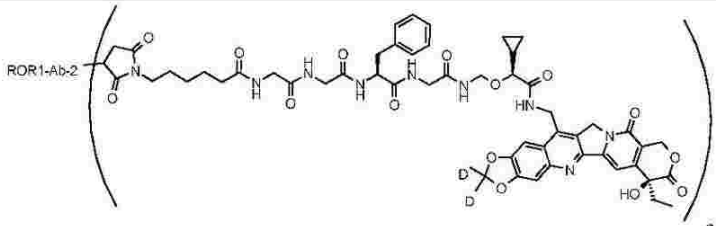
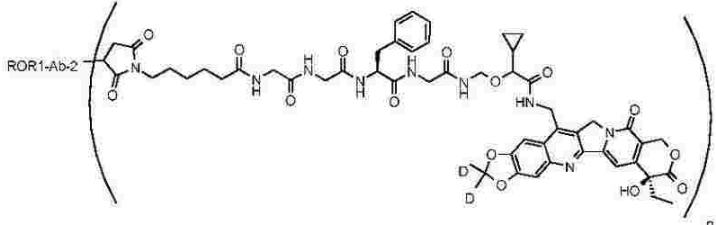
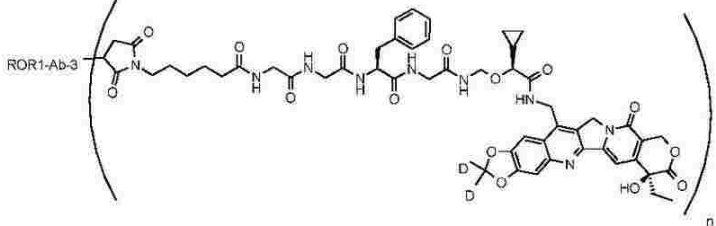
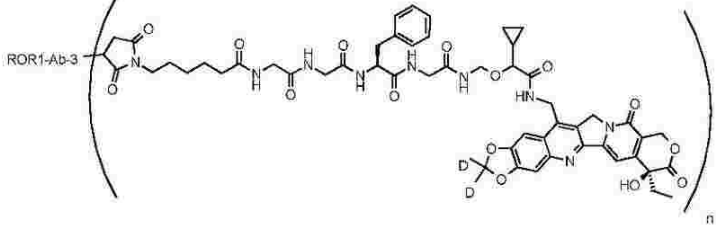
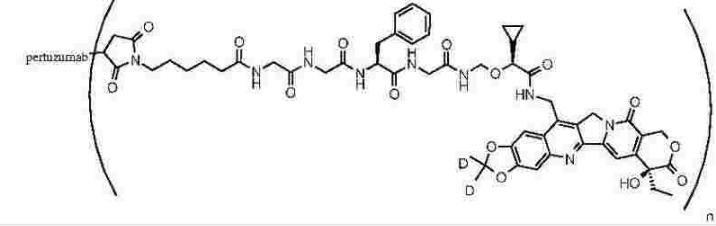
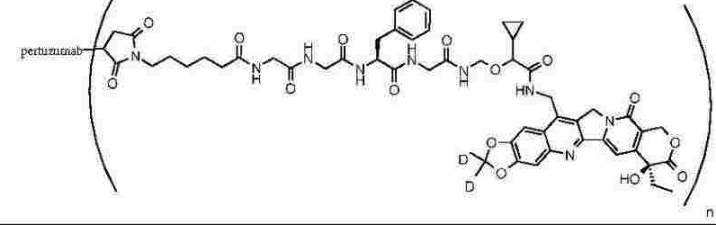
20

30

40

50

【表 2 2 - 5】

ADC-L1- 19-P1-9		7. 7	98. 9 6
ADC-L1- 19-9		7. 3	94. 6 2
ADC-L1- 19-P1-1 0		8. 0	93. 9
ADC-L1- 19-10		7. 2	88. 1
ADC-L1- 19-P1-1 1		7. 3	90. 7 1
ADC-L1- 19-11		7. 0	90. 0 4

【0363】

実施例 41：生物学的活性及び関連する性質試験

以下の試験例における化合物は全て、本開示の上記実施例の方法に従って製造された。

【0364】

試験例 1、式 (D-H) の化合物の抗腫瘍細胞増殖活性試験

細胞及び材料：ヒト結腸直腸癌細胞株 HCT116 は KYINNO Biotechnology から購入し、ヒト乳癌細胞株 SKBR3 は ATCC から購入し、ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 は ATCC から購入し、ウシ血清 (Gibco #10099-141C)、McCoy's 5A 培地 (Gibco #16600-082)、1640 培地 (Gi

b c o # A 1 0 4 9 1 - 0 1) 、ペニシリンーストレプトマイシン (G i b c o # 1 5 1 4 0 - 1 2 2) 及び 0 . 2 5 % の T r y p s i n - E D T A (G i b c o # 2 5 2 0 0 - 0 5 6) は G i b c o 社 (ア メ リ カ) から 購 入 し、ウシインスリン (S o l a r b i o # I 8 0 4 0) は S o l a r b i o 社 から 購 入 し、9 6 ウェルプレート (G r e i n e r B i o - o n e # 6 5 5 0 9 8) は コーニング社 (ア メ リ カ) から 購 入 し、C e l l - T i t e r G l o 試 薬 (P r o m e g a # G 7 5 6 8) は プロメガ社 (ア メ リ カ) から 購 入 し た。

【 0 3 6 5 】

細胞培養：H C T 1 1 6 細胞と S K B R 3 細胞は、何れも 1 0 % のウシ胎児血清 + 1 % のペニシリンーストレプトマイシンを含む M c C o y ' s 5 a 培養液を用いて、3 7 ° C 、5 % の C O ₂ の条件下で培養し、O V C A R 3 細胞は、2 0 % のウシ胎児血清 + 2 μ g / m L のウシインスリン + 1 % のペニシリンーストレプトマイシンを含む 1 6 4 0 培養液を用いて、3 7 ° C 、5 % の C O ₂ の条件下で培養した。対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

10

【 0 3 6 6 】

細胞増殖活性の検出：C e l l - T i t e r G l o 試薬を用いて、H C T 1 1 6 、S K B R 3 及び O V C A R 3 という 3 つの細胞株の増殖に対する化合物の阻害活性を検出した。H C T 1 1 6 細胞 (1 ウェルあたり 1 5 0 0 個) 、S K B R 3 細胞 (1 ウェルあたり 3 0 0 0 個) 及び O V C A R 3 細胞 (1 ウェルあたり 5 0 0 0 個) を 9 6 ウェルプレートに播種し、3 7 ° C 、5 % の C O ₂ の条件下で 2 4 時間培養した。被験化合物溶液を加えた後 (化合物濃度が 1 m M になるように化合物を D M S O で溶解し、次いで D M S O で化合物を 3 μ M に希釈し、3 倍希釈で合計 9 つの濃度にし、1 0 μ L の調製された化合物溶液を 9 6 ウェルプレートに移し、その最終濃度を 0 ~ 3 0 0 n M にする) 、3 7 ° C 、5 % の C O ₂ の条件下で培養し続けた。H C T 1 1 6 細胞を 3 日間培養し、S K B R 3 細胞と O V C A R 3 細胞を 5 日間培養した。C e l l - T i t e r G l o 試薬を加え、細胞活性を検出した。

20

【 0 3 6 7 】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれ B o t t o m 及び T o p として設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

30

【 0 3 6 8 】

データ分析：阻害パーセント (% I n h i b i t i o n) を計算し、且つ化合物 I C ₅₀ をフィッティングした。

【 0 3 6 9 】

阻害パーセント (% I n h i b i t i o n) = 1 - 1 0 0 % × (S i g n a l - B o t t o m) / (T o p - B o t t o m)

S i g n a l は実験群のシグナル値を指し、B o t t o m は陰性対照群の平均シグナル値を指し、T o p は陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【 0 3 7 0 】

実験の結果：

40

本実験条件下で、本開示の化合物は、H C T 1 1 6 細胞、S K B R 3 細胞及び O V C A R 3 細胞の何れに対しても比較的強い増殖阻害活性を示した。本開示の化合物の対応する抗細胞増殖活性は表 1 0 に示される。

【 0 3 7 1 】

50

【表 2 3】

表 1 0 式 (D-H) の化合物の抗腫瘍細胞増殖活性

化合物	HCT 1 1 6 抗増殖活性 I C ₅₀ (nM)	SKBR 3 抗増殖活性 I C ₅₀ (nM)	OVCAR 3 抗増殖活性 I C ₅₀ (nM)
化合物 1	N/A	8. 5	N/A
化合物 3	N/A	3. 6	N/A
化合物 5	N/A	3. 3	N/A
化合物 6	N/A	4. 8	2. 1
化合物 7	++	N/A	N/A
化合物 9	+++	2. 1	N/A
化合物 1 0	+++	2. 3	N/A
化合物 1 1	N/A	3. 2	N/A
化合物 1 3	+++	N/A	0. 7
化合物 1 4	+++	2. 2	0. 9
化合物 1 4-P 1	+++	2. 1	0. 6
化合物 1 4-P 2	++	3. 5	1. 0
化合物 1 5	++	N/A	N/A
化合物 1 6	+++	2. 3	N/A
化合物 1 7	+++	2. 7	N/A
化合物 1 8	++	5. 1	N/A
化合物 1 9	+++	2. 9	1. 0
化合物 1 9-P 1	+++	1. 9	0. 6
化合物 1 9-P 2	+++	2. 9	1. 0
化合物 2 0	++	1 0. 5	N/A
化合物 2 1	+++	4. 0	1. 7
化合物 2 2	+++	3. 5	1. 4
化合物 2 3	+++	5. 3	3. 9
化合物 2 5	+++	3. 7	2. 0
化合物 2 6	+++	4. 2	1. 6
化合物 2 7	++	N/A	N/A
化合物 2 8	+++	N/A	N/A
化合物 2 9	++	N/A	N/A
化合物 3 0	+++	N/A	0. 4
化合物 3 1	+++	N/A	0. 2
化合物 3 3	+++	N/A	0. 8
化合物 3 4	+++	N/A	0. 6
化合物 3 5	+++	3. 5	1. 2
化合物 3 5-P 1	+++	2. 1	0. 5
化合物 3 5-P 2	N/A	3. 6	1. 8

10

20

30

40

【0 3 7 2】

上記表において、結合活性を示すための記号の意味は次の通りである。

【0 3 7 3】

「++++」は、被験化合物の細胞に対する増殖阻害活性 I C₅₀ 範囲が < 1 0 n M であることを示す。

【0 3 7 4】

「++」は、被験化合物の細胞に対する増殖阻害活性 I C₅₀ 範囲が 1 0 ~ 1 0 0 n M であることを示す。

【0 3 7 5】

50

「N/A」は未試験を示す。

【0376】

試験例2、抗p95HER2/HER2二重抗体BsAb02-PのBiacore測定
この実験は、Biacore 8K (GE) 機器を用いて、マルチサイクル動態学を採用
して、被験抗体BsAb02-Pとヒトp95HER2 (hu p95HER2. ECD
-Fc、配列番号104、イタリック体はヒトp95HER2の細胞外領域であり、下線
はFcタグであり：MPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKG
CPAEQRASPLTEPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDITLMISRTP EVT C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
HNAKT K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S
P G K、自己発現により当該タンパク質を製造する) 及びHER2 (Acroから購入、
HE2-H5225) との親和性を測定した。

【0377】

実験作動緩衝液は、1×HBS-EP+緩衝溶液(10mMのHEPES、150mMの
NaCl、3mMのEDTA、0.05%のsurfactant P20)(Cat.
#BR-1006-69、GE)であり、流れセルの温度は25℃に設定され、サンプル
ピンの温度は16℃に設定された。両者とも作動緩衝液で前処理した。Protein
Aバイオセンサーチップ(Cat. #29127556、GE)により一定量の被験抗体
を親和的に捕捉し、次いでチップ表面に一定濃度のヒトp95HER2抗原又はヒトHE
R2抗原を流し、Biacore 8K機器(GE)により反応シグナルをリアルタイム
で検出して結合と解離曲線を得た。各サイクルの解離が完了した後、pH1.5のグリシ
ン-塩酸再生溶液(Cat. #BR-1003-54、GE)で抗原-抗体複合体を洗浄
して再生した。具体的には、溶液中の異なる濃度のヒトp95HER2及びヒトHER2
抗原を240s注射することによりその結合過程を検出し、流速は30μL/minであ
り、50nMから開始し、1:1で希釈し、一連の濃度勾配を設定し、解離時間は900
sにも達し、最後に10mMのグリシン-塩酸溶液(pH 1.5)により30μL/min
の流速で30s洗浄してチップ表面の再生を完了した。

【0378】

実験から得られたデータを、GE Biacore 8K Evaluation ve
rsion 2.0ソフトウェアにより(1:1)Langmuirモデルでフィッティ
ングし、結合速度(Ka)、解離速度(Kd)及び親和性数値(KD)を得、具体的には
表11~12に示す。実験の結果は、本開示のp95HER2/HER2二重抗体がヒト
p95HER2及びHER2に高い親和性で結合することができることを示す。

【0379】

【表24】

表11 p95HER2/HER2二重抗体とヒトp95HER2タンパク質との反応
親和性

抗体	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
BsAb02-P	6.23E+04	6.03E-05	9.68E-10

【0380】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 1 2 p 9 5 H E R 2 / H E R 2 二重抗体とヒト H E R 2 タンパク質との反応親和性

抗体	K a (1 / M s)	K d (1 / s)	K D (M)
B s A b 0 2 - P	2 . 0 7 E + 0 5	6 . 1 1 E - 0 5	2 . 9 5 E - 1 0

【 0 3 8 1】

試験例 3 - 1、フローサイトメトリー (F A C S) による抗 H E R 2 A D C 及び抗体の S K B R 3 腫瘍細胞に対する結合活性の検出

S K B R 3 細胞 (A T C C に由来する) を収集した後に計数し、 2×10^5 個 / ウェルで 9 6 ウェルプレート (C o r n i n g、3 7 9 5) に播種した。勾配希釈した被験サンプルを加え、 4°C で 1 h インキュベートした。氷 P B S で 2 回洗浄した後、A l e x a F l u o r - 6 4 7 ヤギ抗ヒト F c 二次抗体 (J a c k s o n I m m u n o、1 0 9 - 6 0 5 - 0 9 8) を加え、 4°C で 1 h インキュベートした。氷 P B S で 2 回洗浄した後、細胞を再懸濁し、フローサイトメーター (B D F A C S C a n t o TM I I) により平均蛍光強度 (M F I) を分析した。G r a p h p a d P r i s m ソフトウェアを使用してデータに対して 4 パラメータカーブフィッティング解析を行い、E C ₅₀ 値を得て、結果は表 1 3 に示す通りである。

【 0 3 8 2】

【表 2 6】

表 1 3. F A C S による抗 H E R 2 A D C 及び抗体の S K B R 3 腫瘍細胞に対する結合反応の検出

複合体 / 抗体番号	E C ₅₀ (nM)
A D C - L 1 - 1 9 - 2	3 . 3 4
A D C - L 1 - 1 9 - P 1 - 2	3 . 2 6
T r a s t u z u m a b	3 . 3 8
A D C - L 1 - 1 9 - 1 1	4 . 7 5
A D C - L 1 - 1 9 - P 1 - 1 1	4 . 5 1
P e r t u z u m a b	3 . 7 3

【 0 3 8 3】

試験例 3 - 2、抗 R O R 1 A D C 及び抗体の安定形質転換株細胞 M C F 7 - h R O R 1 c l o n e 2 G 2 に対する結合活性試験

安定形質転換株細胞の構築

ヒト R O R 1 アミノ酸配列 (配列番号 1 0 5) をコードするヌクレオチド配列は p L V X レンチウイルスベクターにクローニングされ、且つ H E K 2 9 3 T 細胞中でウイルス粒子を製造した。M C F 7 細胞株 (中国科学院から購入) に対してレンチウイルス感染を行った後、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のピューロマイシン (G i b c o、製品番号 A 1 1 1 3 8 0 3) を含む 1 0 % (w / w) のウシ胎児血清 (E x C e l l B i o、製品番号 F N D 5 0 0) を含む D M E M (G i b c o、製品番号 1 1 9 9 5 0 7 3) 培地で選択的に 1 週間培養し、R O R 1 - A b - 1 及びヤギ抗マウス I g G (H + L) 抗体 (J a c k s o n、製品番号 1 1 5 6 0 5 0 0 6) を用いて、フローサイトメーター F A C S A r i a I I I (B D B i o s c i e n c e s から購入) で異なる発現レベルの陽性細胞群を 9 6 ウェルプレートに選別し、且つ 37°C 、5 % (v / v) の C O ₂ で培養し、約 2 週間後に一部の細胞を選択して増殖し、増殖が比較的良く、蛍光強度が比較的高く、均一性が比較的良い陽性細胞群を選択して、拡大培養し続けて液体窒素で凍結保存した。モノクローナル安定形質転換株細胞の同定は表 1 4 に示される。

【 0 3 8 4】

10

20

30

40

50

【表 27】

表 14 ヒト ROR1 タンパク質の MCF7 安定形質転換細胞株 FACS 検出の結果

番号	安定的にトランスフェクトされた陽性細胞群	細胞平均蛍光密度	
		IgG サブタイプ対照	ROR1-Ab-1
1	MCF7-hROR1 clone 2G2	54.7	26497

全長ヒト ROR1 アミノ酸配列（配列番号 105）：

Q E T E L S V S A E L V P T S S W N I S S E L N K D S Y L T L D E P M N N I T T
 S L G Q T A E L H C K V S G N P P P T I R W F K N D A P V V Q E P R R L S F R S
 T I Y G S R L R I R N L D T T D T G Y F Q C V A T N G K E V V S S T G V L F V K
 F G P P P T A S P G Y S D E Y E E D G F C Q P Y R G I A C A R F I G N R T V Y M
 E S L H M Q G E I E N Q I T A A F T M I G T S S H L S D K C S Q F A I P S L C H
 Y A F P Y C D E T S S V P K P R D L C R D E C E I L E N V L C Q T E Y I F A R S
 N P M I L M R L K L P N C E D L P Q P E S P E A A N C I R I G I P M A D P I N K
 N H K C Y N S T G V D Y R G T V S V T K S G R Q C Q P W N S Q Y P H T H T F T A
 L R F P E L N G G H S Y C R N P G N Q K E A P W C F T L D E N F K S D L C D I P
 A C D S K D S K E K N K M E I L Y

フローサイトメトリー（FACS）による抗 ROR1 ADC 及び抗体の安定形質転換株細胞 MCF7-hROR1 clone 2G2 に対する結合活性の検出

上記ステップで構築した安定形質転換株細胞 MCF7-hROR1 clone 2G2 を T-75 細胞培養フラスコで対数増殖期まで拡大培養し、遠心分離して培地上清を捨て、細胞沈殿を PBS で 2 回洗浄し、被験 ADC 及び抗体を加え、初期濃度は 100 nM であり、8 点に 5 倍勾配希釈し、4 ° で 1 h インキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、二次抗体：Alexa Fluor(R) 647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson Immuno から購入、製品番号：109-605-088) を加え、4 ° C で 1 h インキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、細胞を再懸濁し、FACS (FACS Canto™、BD 社から購入) により検出して分析した。Graphpad Prism ソフトウェアを使用してデータに対して 4 パラメータカーブフィッティング解析を行い、EC₅₀ 値を得て、結果は表 15 に示す通りである。

【0385】

【表 28-1】

表 15. FACS による抗 ROR1 ADC 及び抗体の MCF7-hROR1 clone 2G2 細胞に対する結合活性の検出

複合体／抗体番号	EC ₅₀ (nM)
ADC-L1-19-8	0.68
ADC-L1-19-P1-8	0.34
ADC-L1-0-8	0.75
ROR1-Ab-1	0.99
ADC-L1-19-9	0.42
ADC-L1-19-P1-9	0.50
ADC-L1-0-9	0.43
ROR1-Ab-2	0.98

10

20

30

40

50

【表 28-2】

ADC-L1-19-10	0.98
ADC-L1-19-P1-10	0.57
ADC-L1-0-10	1.25
ROR1-Ab-3	0.91

【0386】

試験例 3-3、フローサイトメトリー（FACS）による抗 LIV-1 ADC 及び抗体の OVCAR3 腫瘍細胞に対する結合活性の検出

10

OVCAR3 細胞（ATCC に由来する）は、LIV-1 高発現の腫瘍モデルに属し、OVCAR3 細胞を収集した後に計数し、 2×10^5 個／ウェルで 96 ウェルプレート（Corning、3795）に播種した。勾配希釈した被験サンプルを加え、4℃で 1 h インキュベートした。氷 PBS で 2 回洗浄した後、Alexa Fluor-647 Goat anti-human Fc 二次抗体（Jackson Immuno、109-605-098）を加え、4℃で 1 h インキュベートした。氷 PBS で 2 回洗浄した後、細胞を再懸濁し、フローサイトメーター（BD FACSCanto™ II）により平均蛍光強度（MFI）を分析した。Graphpad Prism ソフトウェアを使用してデータに対して 4 パラメータカーブフィッティング解析を行い、EC₅₀ 値を得て、結果は表 16 に示す通りである。

20

【0387】

【表 29】

表 16. FACS による抗 LIV-1 ADC 及び抗体の OVCAR3 腫瘍細胞に対する結合反応の検出

複合体／抗体番号	EC ₅₀ (nM)
ADC-L1-19-7	0.83
ADC-L1-19-P1-7	0.67
ADC-L1-0-7	1.45
LIV1-Ab-1	0.53

30

【0388】

試験例 4-1、抗 HER2-ADC 腫瘍細胞増殖活性試験 1

細胞及び材料：ヒト乳癌細胞株 SKBR3 は ATCC から購入し、ヒト乳癌細胞株 SKBR3-p95HER2 は海南先声再明医薬株式有限公司で構築され（構築方法は特許出願 CN202210094806.6 を参照する）、ヒト卵巣癌細胞株 SKOV3 は ATCC から購入し、ウシ血清、McCoy's 5a 培地、ペニシリン-ストレプトマイシン及び 0.25% の Trypsin-EDTA は Gibco 社（アメリカ、製品番号は試験例 1 と同じである）から購入し、96 ウェルプレートはコニング社（アメリカ、製品番号は試験例 1 と同じである）から購入し、Cell-Titer Glo 試薬はプロメガ社（アメリカ、製品番号は試験例 1 と同じである）から購入した。

40

【0389】

細胞培養：SKBR3 細胞、SKBR3-p95HER2 細胞及び SKOV3 細胞は、何れも 10% のウシ胎児血清 + 1% のペニシリン-ストレプトマイシンを含む McCoy's 5a 培養液を用いて、37℃、5% の CO₂ の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

【0390】

細胞増殖活性の検出：Cell-Titer Glo 試薬を用いて、SKBR3、SKBR3-p95HER2 及び SKOV3 という 3 つの細胞株の増殖に対する ADC の阻害活性を検出した。SKBR3 細胞（1 ウェルあたり 3000 個）、SKBR3-p95HE

50

R2細胞（1ウェルあたり3000個）及びSKOV3細胞（1ウェルあたり600個）を96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のCO₂の条件下で24時間培養した。被験ADC溶液を加えた後（ADCを上記対応する細胞の培地で希釈し、ADC濃度を20nM又は200nMに調整し、次いで培地で3倍勾配希釈し続けて合計8つの濃度であり、10μLの調製されたADC溶液を96ウェルプレートに移し、初期最終濃度を実際に2nM又は20nMにする）、37℃、5%のCO₂の条件下で培養し続けた。SKBR3細胞、SKBR3-p95HER2細胞及びSKOV3細胞を5日間培養した。Cell-Titer Glo試薬を加え、細胞活性を検出した。

【0391】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれBottom及びTopとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0392】

データ分析：阻害パーセント（% Inhibition）を計算し、且つ化合物IC₅₀をフィッティングした。

【0393】

阻害パーセント（% Inhibition）= $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0394】

実験の結果：本実験条件下で、本開示のADCは、SKBR3細胞、SKBR3-p95HER2細胞及びSKOV3細胞の何れに対しても比較的強い増殖阻害活性を示し、詳しくは表17に示す。

【0395】

【表30】

表17 ADCの抗腫瘍細胞増殖活性

複合体番号	SKBR3/p95 抗増殖活性 (IC ₅₀ , nM)	SKBR3 抗増殖活性 (IC ₅₀ , nM)	SKOV3 抗増殖活性 (IC ₅₀ , nM)
ADC-L1-14-P2-1	0.05187	N/A	N/A
ADC-L2-14-P2-1	0.03691	N/A	N/A
ADC-L1-21-1	0.1428	N/A	N/A
ADC-L2-21-1	0.1694	N/A	N/A
ADC-L2-31-2	N/A	0.04567	0.2052
ADC-L1-14-P1-2	N/A	0.03227	0.1249
ADC-L1-14-P2-2	N/A	0.03108	0.116

「N/A」は未試験を示す。

【0396】

試験例4-2、抗HER2-ADC腫瘍細胞増殖活性試験2

細胞及び材料：ヒト乳管癌細胞株T47D（中発現細胞株）はATCCから購入し、ヒト乳癌細胞株SKBR3はATCCから購入し、McCoy's 5a培地（Gibco#16600-082）、1640培地（Gibco#A10491-01）、ペニシリン-ストربتマイシン（Gibco#15140-122）及び0.25%のTrypsin-EDTA（Gibco#25200-056）はGibco社（アメリカ）から購入し、96ウェルプレート（Greiner Bio-one#655098）はコーニ

ング社（アメリカ）から購入し、Cell-Titer Glo 試薬（Promega # G7568）はプロメガ社（アメリカ）から購入した。

【0397】

細胞培養：SKBR3細胞は、10%のウシ胎児血清＋1%のペニシリンーストレプトマイシンを含むMcCoy's 5a培養液を用い、T47D細胞は、10%のウシ胎児血清＋1%のペニシリンーストレプトマイシンを含む1640培養液を用い、2株の細胞とも37℃、5%のCO₂の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

【0398】

細胞増殖活性の検出：Cell-Titer Glo 試薬を用いて、SKBR3とT47Dとの2つの細胞株の増殖に対するADCの阻害活性を検出した。SKBR3及びT47D細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を調整した。T47D細胞は2000個の細胞／90μL／ウェルであり、96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のCO₂の条件下で一晩培養した。完全培地でADC濃度を1000nMに希釈し、且つ3倍勾配希釈して、合計8つの濃度勾配であり、次いで10μLのADC希釈溶液を96ウェルプレートに移し、即ち、ADCの初期最終濃度が100nMであった。96ウェルプレートを37℃、5%のCO₂の条件下で7日間培養した。Cell-Titer Glo 試薬を加え、細胞活性を検出した。

10

【0399】

SKBR3細胞は5000個の細胞／90μL／ウェルであり、96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のCO₂の条件下で一晩培養した。完全培地でADC濃度を1000nMに希釈し、且つ5倍勾配希釈して、合計9つの濃度勾配であり、次いで10μLのADC希釈溶液を96ウェルプレートに移し、即ち、ADCの初期最終濃度が100nMであった。96ウェルプレートを37℃、5%のCO₂の条件下で3日間培養した。Cell-Titer Glo 試薬を加え、細胞活性を検出した。

20

【0400】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれBottom及びTopとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0401】

データ分析：

30

阻害パーセント（% Inhibition）を計算し、且つ化合物IC₅₀をフィッティングした。

【0402】

阻害パーセント（% Inhibition）＝ $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$ 。

【0403】

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0404】

実験の結果：

40

本実験条件下で、本開示の抗HER2-ADCは、ヒト乳管癌細胞株T47D及びヒト乳癌細胞株SKBR3に対して比較的強い増殖阻害活性を示し、表18に示す。

【0405】

50

【表 3 1】

表 1 8 ADCの抗腫瘍細胞増殖活性

複合体番号	T 4 7 D		S K B R 3	
	I C ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)	I C ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L 1-1 9-1 1	5. 3 2 9	8 9. 4	0. 0 0 0 5 0 4 1	6 4. 5
ADC-L 1-1 9-P 1-1 1	1. 6 7 1	8 8. 9	0. 0 1 2 2 5	5 5. 4
ADC-L 1-0 0-1 1	1 2. 1 6	9 0. 8	1. 4 1 3	3 5. 4
ADC-L 1-1 9-2	6. 9 3	9 0. 6	0. 0 8 3 2	5 4. 0
ADC-L 1-1 9-P 1-2	3. 5 5 2	9 2. 5	0. 0 8 5 2	5 4. 3
ADC-L 1-0 0-2	1 3. 9 7	9 0. 5	0. 4 4 2 4	4 1. 7

【0 4 0 6】

試験例 5、抗 CDH 6 抗体の対応する ADC に対する細胞結合活性

OVCAR 3 細胞を収集した後に計数し、 2×10^5 個／ウェルで 96 ウェルプレート（Corning、3795）に播種した。勾配希釈した被験サンプルを加え、4℃で 1 h インキュベートした。氷 PBS で 2 回洗浄した後、Alexa Fluor-647 Goat anti-human Fc 二次抗体（Jackson Immuno、109-605-098）を加え、4℃で 1 h インキュベートした。氷 PBS で 2 回洗浄した後、細胞を再懸濁し、フローサイトメーター（BD FACSCanto™ II）により平均蛍光強度（MFI）を分析した。Graphpad Prism ソフトウェアを使用してデータに対して 4 パラメータカーブフィッティング解析を行い、EC₅₀ 値を得て、結果は表 1 9 に示す通りである。

【0 4 0 7】

【表 3 2】

表 1 9 CDH 6 抗体及び CDH 6-ADC の OVCAR 3 細胞に対する結合活性

複合体／抗体番号	EC ₅₀ (nM)
ADC-L 1-1 4-P 1-3	0. 4 9
ADC-L 1-1 9-3	0. 3 4
ADC-L 1-1 9-P 1-3	0. 3 6
CDH 6-A b	0. 7 1
ADC-L 1-1 9-5	0. 5 1
ADC-L 1-1 9-P 1-5	0. 5 3
CDH 6-A b-2	0. 6 3
ADC-L 1-1 9-6	0. 8 5
ADC-L 1-1 9-P 1-6	0. 8 0
CDH 6-A b-3	0. 7 8

【0 4 0 8】

試験例 6-1、抗 CDH 6-ADC 抗腫瘍細胞増殖活性試験

細胞及び材料：ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR 3（CDH 6 高発現細胞株）は ATCC から購入し、ヒト卵巣奇形腫細胞株 PA-1 は ATCC から購入し、ウシ血清、1640 培地（Gibco #A10491-01）、MEM 培地（Gibco #11095-080）、MEM NEAA（Gibco #11140-050）、ピルビン酸ナトリウム（Gibco #11360-070）、ペニシリン-ストレプトマイシン及び 0.25% の Trypsin-EDTA（Gibco #25200-056）は Gibco 社から購入し、ウシインスリンは Solarbio 社から購入し、96 ウェルプレートはコニング社（

アメリカ) から購入し、Cell-Titer Glo 試薬はプロメガ社 (アメリカ) から購入した。

【0409】

細胞培養：OVCAR3細胞は、20%のウシ胎児血清+2μg/mLのウシインスリン+1%のペニシリン-ストربتマイシンを含む1640培養液を用いて、37℃、5%のCO₂の条件下で培養し、PA-1細胞は、何れも10%のウシ胎児血清+1%のMEM NEAA+1%のピルビン酸ナトリウム+1%のペニシリン-ストربتマイシンを含むMEM培養液を用いて、37℃、5%のCO₂の条件下で培養した。対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

【0410】

細胞増殖活性の検出：Cell-Titer Glo 試薬を用いて、OVCAR3とPA-1との2つの細胞株の増殖に対するADCの阻害活性を検出した。OVCAR3及びPA-1細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を調整し、OVCAR3細胞 (1ウェルあたり5000個) 及びPA-1 (1ウェルあたり800個) を96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のCO₂の条件下で24時間培養した。被験ADC溶液を加えた後 (ADCを上記対応する細胞の培地で希釈し、ADC濃度を100nMにし、次いで培地で3倍勾配希釈し続けて合計8つの濃度であり、10μLの調製されたADC溶液を96ウェルプレートに移し、初期最終濃度を0~10nMにする)、37℃、5%のCO₂の条件下で培養し続けた。OVCAR3細胞及びPA-1細胞を5日間培養した。Cell-Titer Glo 試薬を加え、細胞活性を検出した。

【0411】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれBottom及びTopとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0412】

データ分析：阻害パーセント (% Inhibition) を計算し、且つ化合物IC₅₀をフィッティングした。

【0413】

阻害パーセント (% Inhibition) = $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0414】

実験の結果：本実験条件下で、本開示の抗CDH6-ADCは、ヒト卵巣癌細胞株OVCAR3及びヒト卵巣奇形腫細胞株PA-1細胞の何れに対しても比較的強い増殖阻害活性を示し、詳しくは表20に示す。

【0415】

【表33-1】

表20 ADCの抗腫瘍細胞増殖活性

複合体番号	OVCAR3	PA-1
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
ADC-L1-14-P1-3	0.012	0.063
ADC-L1-35-P1-3	0.018	0.043
ADC-L1-19-P1-3	0.015	0.018

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 2】

ADC-L1-19-3	0.015	0.0094
ADC-L1-14-P1-6	0.031	0.070
ADC-L1-19-P1-6	0.015	0.017
ADC-L1-19-6	0.022	0.023
ADC-L1-14-P1-5	0.028	0.030
ADC-L1-19-P1-5	0.019	0.018
ADC-L1-19-5	0.021	0.017

10

【0416】

試験例 6-2、抗 L I V - 1 - A D C 抗腫瘍細胞増殖活性試験

細胞及び材料：ヒト卵巣癌細胞株 O V C A R 3、ヒト非小細胞肺癌細胞株 H 8 3 8 は A T C C から購入し、1640 培地 (G i b c o # A 1 0 4 9 1 - 0 1)、ペニシリンーストレプトマイシン (G i b c o # 1 5 1 4 0 - 1 2 2) 及び 0.25% の T r y p s i n - E D T A (G i b c o # 2 5 2 0 0 - 0 5 6) は G i b c o 社 (アメリカ) から購入し、ウシインスリン (S o l a r b i o # I 8 0 4 0) は S o l a r b i o 社 (アメリカ) から購入し、96 ウェルプレート (G r e i n e r B i o - o n e # 6 5 5 0 9 8) は コーニング社 (アメリカ) から購入し、C e l l - T i t e r G l o 試薬 (P r o m e g a # G 7 5 6 8) はプロメガ社 (アメリカ) から購入した。

20

【0417】

細胞培養：O V C A R 3 細胞は、20% のウシ胎児血清 + 2 μ g / mL のウシインスリン + 1% のペニシリンーストレプトマイシンを含む 1640 培養液を用いて、37℃、5% の C O ₂ の条件下で培養し、H 8 3 8 細胞は、10% のウシ胎児血清 + 1% のペニシリンーストレプトマイシンを含む 1640 培養液を用いて、37℃、5% の C O ₂ の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

【0418】

細胞増殖活性の検出：C e l l - T i t e r G l o 試薬を用いて、O V C A R 3 と H 8 3 8 細胞株の増殖に対する A D C の阻害活性を検出した。O V C A R 3 又は H 8 3 8 細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を調整し、O V C A R 3 細胞は 1500 個の細胞 / 90 μ L / ウェルであり、H 8 3 8 細胞は 450 個の細胞 / 90 μ L / ウェルであり、96 ウェルプレートに播種し、37℃、5% の C O ₂ の条件下で一晩培養した。完全培地で A D C 濃度を 5000 nM に希釈し、且つ 3 倍勾配希釈して、合計 8 つの濃度勾配であり、次いで 10 μ L の A D C 希釈溶液を 96 ウェルプレートに移し、即ち、A D C の初期最終濃度が 500 nM であった。96 ウェルプレートを 37℃、5% の C O ₂ の条件下で 5 日間培養した。C e l l - T i t e r G l o 試薬を加え、細胞活性を検出した。

30

【0419】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれ B o t t o m 及び T o p として設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

40

【0420】

データ分析：

阻害パーセント (% I n h i b i t i o n) を計算し、且つ化合物 I C ₅₀ をフィッティングした。

【0421】

阻害パーセント (% I n h i b i t i o n) = $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$ 。

【0422】

50

S i g n a lは実験群のシグナル値を指し、B o t t o mは陰性対照群の平均シグナル値を指し、T o pは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0423】

実験の結果：

本実験条件下で、本開示の抗L I V - 1 - A D Cは、ヒト卵巣癌細胞株O V C A R 3、ヒト非小細胞肺癌細胞株H 8 3 8に対して比較的強い増殖阻害活性を示し、詳しくは表21に示す。

【0424】

【表34】

表21 ADCの抗腫瘍細胞増殖活性

複合体番号	H 8 3 8		O V C A R 3	
	I C ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)	I C ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L1-19-7	21.8	97.5	5.126	90.7
ADC-L1-19-P1-7	17.3	96.6	3.195	91.6
ADC-L1-0-7	127.8	90.9	10.5	85.3

10

【0425】

試験例6-3、抗R O R 1 - A D C抗腫瘍細胞増殖活性試験

細胞及び材料：ヒト乳癌細胞株h R O R 1 - M C F 7は海南先声再明医薬株式有限公司で構築され、D M E M培地（G i b c o # 1 1 9 9 5 - 0 6 5）、ペニシリンーストレプトマイシン（G i b c o # 1 5 1 4 0 - 1 2 2）及び0.25%のT r y p s i n - E D T A（G i b c o # 2 5 2 0 0 - 0 5 6）は、G i b c o社（アメリカ）から購入し、96ウェルプレート（G r e i n e r B i o - o n e # 6 5 5 0 9 8）はコーニング社（アメリカ）から購入し、C e l l - T i t e r G l o試薬（P r o m e g a # G 7 5 6 8）はプロメガ社（アメリカ）から購入した。

20

【0426】

細胞培養：h R O R 1 - M C F 7細胞は、10%のウシ胎児血清+1%のペニシリンーストレプトマイシンを含むD M E M培養液を用いて、37℃、5%のC O₂の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

30

【0427】

細胞増殖活性の検出：C e l l - T i t e r G l o試薬を用いて、h R O R 1 - M C F 7細胞株の増殖に対するA D Cの阻害活性を検出した。h R O R 1 - M C F 7細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を調整し、h R O R 1 - M C F 7細胞は1700個の細胞/90μL/ウェルであり、96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のC O₂の条件下で一晩培養した。完全培地でA D C濃度を500nMに希釈し、且つ4倍勾配希釈して、合計9つの濃度勾配であり、次いで10μLのA D C希釈溶液を96ウェルプレートに移し、即ち、A D Cの初期最終濃度が50nMであった。96ウェルプレートで37℃、5%のC O₂の条件下で5日間培養した。C e l l - T i t e r G l o試薬を加え、細胞活性を検出した。

40

【0428】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれB o t t o m及びT o pとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0429】

データ分析：

阻害パーセント（% I n h i b i t i o n）を計算し、且つ化合物I C₅₀をフィッティングした。

【0430】

50

阻害パーセント（% Inhibition）＝ $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$ 。

【0431】

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0432】

実験の結果：

本実験条件下で、本開示の抗ROR1-ADCは、ヒト卵巣癌細胞株hROR1-MCF7に対して比較的強い増殖阻害活性を示し、詳しくは表22に示す。

【0433】

【表35】

表22 ADCの抗腫瘍細胞増殖活性

複合体番号	hROR1-MCF7	
	IC ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L1-19-8	0.18	39.88
ADC-L1-19-P1-8	0.10	38.61
ADC-L1-19-9	0.31	42.34
ADC-L1-19-P1-9	0.22	44.73
ADC-L1-19-10	0.04	37.45
ADC-L1-19-P1-10	0.03	44.77

試験例7、OVCAR3皮下腫瘍モデル薬効評価-1

実験試薬：ヒト卵巣癌OVCAR3細胞はATCCから購入し、RPMI-1640培地はGibco（製品番号A104910）から購入し、ウシ胎児血清はExcell（製品番号FND500）から購入し、ペニシリン-ストレプトマイシンはGibco（製品番号15140122）から購入し、ウシインスリンはYeasen（製品番号40107ES60）から購入し、0.25%のトリプシン-EDTAはGibco（製品番号25200-072）から購入し、D-PBS（カルシウム・マグネシウムイオンを含まないリン酸塩緩衝液）はHyclone（製品番号SH30256.01）から購入し、Matrigel（マトリゲル）はCorning（製品番号356237）から購入した。

【0434】

実験方法：

動物情報：Balb/c nudeマウス、雌、5～6週齢で、体重が約14～20グラムであり、動物は北京維通利華生物技術有限公司から購入し、マウスをSPFグレードの環境で飼育し、各ケージ位置に単独で送風及び排風し、全ての動物は標準認証された商業実験室の食餌を自由に摂取して自由に摂水することができる。

【0435】

細胞培養：ヒト卵巣癌OVCAR3細胞株をインビトロで培養し、培養条件は、RPMI-1640に20%のウシ胎児血清、1%のペニシリン-ストレプトマイシン、10μg/mLのウシインスリンを加えることで、37℃、5%のCO₂インキュベーターであった。0.25%のトリプシン-EDTA消化液で慣例的な消化処理を週に1回行って継代した。細胞飽和度が80%～90%で、数量が要求に達した場合、細胞を収集し、計数した。

【0436】

細胞播種：0.1mLのOVCAR3細胞懸濁液（ 1×10^7 個の細胞を含み、RPMI-1640：Matrigel体積比は1：1である）を各マウスの腋下に皮下播種した。細胞播種後の26日目に、腫瘍体積に応じてランダムに群分けして投与し、群分け当日をDay 0とした。

【0437】

腫瘍の測定及び実験指標：

ノギスで腫瘍の直径を週に2回測定した。腫瘍体積の計算式は $V = 0.5 a \times b^2$ であり、 a と b はそれぞれ腫瘍の長径と短径を示す。マウスの体重を週に2回測定した。

【0438】

腫瘍増殖阻害率TGI(%)を用いて、被験薬物の腫瘍阻害効果を評価した。TGI(%) = $[(1 - (\text{ある処理群の投与終了時の平均腫瘍体積} - \text{当該処理群の投与開始時の平均腫瘍体積}) / (\text{溶媒対照群の治療終了時の平均腫瘍体積} - \text{溶媒対照群の治療開始時の平均腫瘍体積}))] \times 100\%$ 。

【0439】

実験の結果：

マウス皮下移植腫瘍OVCAR3モデルにおいて、ADC-L1-14-P1-5は、3 mg/kgの用量で、単回静脈内投与後に何れも腫瘍増殖に対して顕著な阻害作用を有した($P < 0.0001$)。結果は表23及び図2に示される。

【0440】

【表36】

表23 OVCAR3皮下腫瘍モデルの腫瘍体積

被験薬物	投与量 (mg/kg)	投与方式	投与 頻度	平均腫瘍体積 (mm ³)										TGI (%)
				Day 0	Day 4	Day 7	Day 11	Day 14	Day 18	Day 22	Day 25	Day 28	Day 28	
溶媒対照群	/	静脈内 注射 (IV)	単回	15 4.3	24 7.1	29 7.8	33 5.8	42 0.3	56 8.8	59 8.1	73 4.3	87 3.7	/	
ADC-DS	3			15 4.4	21 1.3	19 4.1	15 9.5	13 1.5	95. 5	73. 6	66. 0	77. 8	11 0.6	
ADC-L1-14-P1-5	3			15 1.4	20 7.0	18 3.5	14 3.4	11 3.3	71. 3	64. 1	69. 7	66. 9	11 1.7	

【0441】

マウス皮下移植腫瘍OVCAR3モデルにおいて、ADC-L1-19-P1-5は、3 mg/kgの用量で、単回静脈内投与後に何れも腫瘍増殖に対して顕著な阻害作用を有した($P < 0.0001$)。結果は表24及び図3に示される。

【0442】

【表37-1】

表24 OVCAR3皮下腫瘍モデルの腫瘍体積

被験薬物	投与量 (mg/kg)	投与 方式	投与 頻度	平均腫瘍体積 (mm ³)										TGI (%)
				Day 0	Day 5	Day 8	Day 12	Day 16	Day 19	Day 22	Day 27	Day 27		

【表37-2】

溶媒対照群	/	静脈内 注射 (IV)	単回	15 1.7	22 3.8	24 6.0	29 9.3	37 0.5	40 9.4	46 2.8	50 6.9	/	
ADC-DS	3			14 5.0	16 5.9	15 3.4	91. 4	56. 2	41. 2	28. 9	23. 4	13 4.2	
ADC-L1-19-P1-5	3			15 3.4	16 5.0	14 9.3	97. 3	68. 7	56. 6	49. 4	27. 3	13 5.5	

【0443】

試験例8、ADC血漿安定性試験

ADC分子(最終濃度100 µg/mL)を、37℃のインキュベーター中で、それぞれ

ヒト血漿（*oribiotech*、PB021-C）及びサル血漿（*Shinuoda Biological Technology Co., Ltd.*、SND-X0107）とインキュベートした。インキュベーションの当日を0日目と標識し、その後、それぞれ7日目、14日目及び28日目にサンプルを取り出し、遊離小分子の検出を行った。

【0444】

20 µLのサンプルを取り、300 µLの内部標準作動液（アセトニトリル調製）を加え、5分間ボルテックスして均一に混合し、5分間遠心分離し（14000 rpm）、4 µLの上清液をLC-MS/MS（API 6500+）に注入して分析し、結果は表25に示される。結果は、試験されたADC分子がヒト血漿及びサル血漿の両方においても比較的安定であることを示す。

【0445】

【表38】

表25 CDH6-ADCの血漿安定性

血漿タイプ	インキュベーション時間 (日)	遊離小分子%	
		ADC-DS	ADC-L1-19-P1-5
ヒト血漿	0	0.59	N/A
	7	0.72	0.32
	14	1.21	0.54
	28	1.90	0.99
サル血漿	0	0.64	N/A
	7	2.28	0.34
	14	4.03	0.75
	28	9.66	1.53

N/Aは、遊離小分子が検出されず、遊離小分子%を計算することができないことを示す。

【0446】

試験例9、OVCA R3皮下腫瘍モデル薬効評価-2

実験試薬：

ヒト卵巣癌OVCA R3細胞：ATCC

RPMI-1640培養液：Gibco、Cat No.：A104910

ウシ胎児血清：Excell、FND500

ウシインスリン：Yeasen、40107ES60

0.25%のトリプシン-EDTA：Gibco、Cat No：25200-072

D-PBS（カルシウム・マグネシウムイオンを含まないリン酸塩緩衝液）：Hyclone、Cat. No.：SH30256.01

Matrigel：Corning、Cat. No.：356237

実験方法：

動物情報：Balb/c nudeマウス、雌、5～6週齢で、体重が約14～20グラムであり、動物は北京維通利華生物技術有限公司から購入し、マウスをSPFグレードの環境で飼育し、各ケージ位置に単独で送風及び排風し、全ての動物は標準認証された商業実験室の食餌を自由に摂取して自由に摂水することができる。

【0447】

細胞培養：ヒト卵巣癌OVCA R3細胞株をインビトロで培養し、培養条件は、RPMI-1640（細胞培養液）に20%のウシ胎児血清、1%のPen Strep、10 µg/mLのウシインスリンを加えることで、37℃、5%のCO₂インキュベーターであった。0.25%のトリプシン-EDTA消化液で慣例的な消化処理を週に1回行って継代した。細胞飽和度が80%～90%で、数量が要求に達した場合、細胞を収集し、計数

した。

【0448】

細胞播種：0.1 mL / (1 × 10⁷ 個の細胞を含む) OVCAR3 細胞懸濁液 (RPMI-1640: Matrigel、体積比は1:1である) を各マウスの腋下に皮下播種した。細胞播種後の23日目に、腫瘍体積に応じてランダムに群分けして投与し、群分け当日を Day 0 とした。

【0449】

投与：ADC-L1-19-P1-7 及びアイソタイプ対照 ADC-L1-19-P1-ISO の投与量は、何れも 3 mg / kg であり、腹腔内投与 (Q4D) であった。1 群あたり 6 匹のマウスであった。

【0450】

腫瘍の測定及び実験指標：

ノギスで腫瘍の直径を週に2回測定した。腫瘍体積の計算式は $V = 0.5 a \times b^2$ であり、a と b はそれぞれ腫瘍の長径と短径を示す。マウスの体重を週に2回測定した。

【0451】

腫瘍増殖阻害率 TGI (%) を用いて、化合物の腫瘍阻害効果を評価した。TGI (%) = [(1 - (ある処理群の投与終了時の平均腫瘍体積 - 当該処理群の投与開始時の平均腫瘍体積) / (溶媒対照群の治療終了時の平均腫瘍体積 - 溶媒対照群の治療開始時の平均腫瘍体積))] × 100 %。

【0452】

実験の結果：

表26、図4及び図5を参照する。

【0453】

【表39】

表26 OVCAR3皮下腫瘍モデルの腫瘍体積

被験薬物	投与量 (mg / kg)	投与 方式	投与 頻度	平均腫瘍体積 (mm ³)								TGI (%)
				0日	4日	7日	11日	14日	26日	33日	40日	
溶媒対照群	/	腹腔内 注射	4日に 1回	129	175	229	287	319	597	778	912	/
ADC-L1-19-P1-ISO	3			124	171	174	183	182	155	175	248	84.2
ADC-L1-19-P1-7	3			126	161	140	108	79	55	63	65	107.93

【0454】

実験の結論：

マウス皮下移植腫瘍 OVCAR3 モデルにおいて、本開示の化合物 ADC-L1-19-P1-7 及びアイソタイプ対照 ADC-L1-19-P1-ISO は、3 mg / kg で、4 日に1回腹腔内投与する場合に腫瘍増殖に対して顕著な阻害作用を有するが (P < 0.0001)、アイソタイプ対照 ADC-L1-19-P1-ISO の腫瘍阻害は、ADC-L1-19-P1-7 よりも顕著に弱かった (P < 0.001)。本実施例では、試験した用量で、マウスの体重に影響を与えることが発見されず、如何なるマウスの死亡も引き起こさず、マウスは耐えることができる。

【0455】

試験例10、NCI-H838皮下腫瘍モデル薬効評価

実験試薬：

ヒト肺癌 NCI-H838 細胞：Cobioer

RPMI-1640 培養液：Gibco、Cat No. : 61870-036

ウシ胎児血清：Gibco、Cat No. : 10099-141C

0.25% のトリプシン-EDTA：Gibco、Cat No : 25200-072

D-PBS (カルシウム・マグネシウムイオンを含まないリン酸塩緩衝液)：Hyclone

ne、Cat. No. : SH30256.01

Matrigel : Corning、Cat. No. : 356237

実験方法：

動物情報：B-NDGマウス、雌、5～6週齢で、体重が約14～20グラムであり、動物は百奥賽図から購入し、マウスをSPFグレードの環境で飼育し、各ケージ位置に単独で送風及び排風し、全ての動物は標準認証された商業実験室の食餌を自由に摂取して自由に摂水することができる。

【0456】

細胞培養：ヒト肺癌NCI-H838細胞株をインビトロで培養し、培養条件は、RPMI-1640（細胞培養液）に10%のウシ胎児血清、1%のPen Strepを加えることで、37℃、5%のCO₂インキュベーターであった。0.25%のトリプシン-EDTA消化液で慣例的な消化処理を週に2回行って継代した。細胞飽和度が80%～90%で、数量が要求に達した場合、細胞を収集し、計数した。

10

【0457】

細胞播種：0.1mL / (1×10⁷個の細胞を含む) NCI-H838細胞懸濁液（RPMI-1640 : Matrigel、体積比は1 : 1である）を各マウスの腋下に皮下播種した。細胞播種後の23日目に、腫瘍体積に応じてランダムに群分けして投与し、群分け当日をDay 0とした。

【0458】

投与：ADC-L1-19-P1-7及びアイソタイプ対照ADC-L1-19-P1-ISOの投与量は、何れも3mg / kgであり、何れも腹腔内投与（Q4D）であった。1群あたり6匹のマウスであった。

20

【0459】

腫瘍の測定及び実験指標：

ノギスで腫瘍の直径を週に2回測定した。腫瘍体積の計算式は $V = 0.5 a \times b^2$ であり、aとbはそれぞれ腫瘍の長径と短径を示す。マウスの体重を週に2回測定した。

【0460】

腫瘍増殖阻害率TGI（%）を用いて、化合物の腫瘍阻害効果を評価した。TGI（%）= [(1 - (ある処理群の投与終了時の平均腫瘍体積 - 当該処理群の投与開始時の平均腫瘍体積) / (溶媒対照群の治療終了時の平均腫瘍体積 - 溶媒対照群の治療開始時の平均腫瘍体積))] × 100%。

30

【0461】

実験の結果：

表27、図6及び図7を参照する。

【0462】

【表40】

表27 H838皮下腫瘍モデルの腫瘍体積

被験薬物	投与量 (mg / kg)	投与 方式	投与 頻度	平均腫瘍体積 (mm ³)							TGI (%)
				0日	3日	8日	11日	14日	17日	21日	
溶媒対照群	/	腹腔内 注射	4日に 1回	99	137	322	449	758	959	1444	/
ADC-L1-19 -P1-ISO	3			98	126	202	240	315	461	707	54.8
ADC-L1-19 -P1-7	3			99	138	149	163	163	200	290	85.8

40

実験の結論：

マウス皮下移植腫瘍NCI-H838モデルにおいて、本開示の化合物ADC-L1-19-P1-7及びアイソタイプ対照ADC-L1-19-P1-ISOは、3mg / kgで、4日に1回腹腔内投与する場合に腫瘍増殖に対して顕著な阻害作用を有するが（P < 0.0001）、アイソタイプ対照ADC-L1-19-P1-ISOの腫瘍阻害は、A

50

DC-L1-19-P1-7よりも顕著に弱かった ($P < 0.001$)。本実施例では、試験した用量で、マウスの体重に影響を与えることが発見されず、如何なるマウスの死亡も引き起こさず、マウスは耐えることができる。

【0463】

試験例11、抗LIV-1-ADCのバイスタンダー効果試験

細胞及び材料：ヒト卵巣癌細胞株OVCAR3はATCCから購入し、ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H838-hLIV1-KOは自ら構築され、ウシ血清 (Gibco # 10099-141C)、1640培地 (Gibco # A10491-01)、ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco # 15140-122) 及び0.25%のTrypsin-EDTA (Gibco # 25200-056) はGibco社 (アメリカ) から購入し、ウシインスリン (Solarbio # I8040) はSolarbio社から購入し、96ウェルプレート (Greiner Bio-one # 655098) はコーニング社 (アメリカ) から購入し、Cell-Titer Glo 試薬 (Promega # G7568) はプロメガ社 (アメリカ) から購入した。

10

【0464】

NCI-H838-hLIV1-KOの構築方法：ヒトLIV1遺伝子に対して6種類のsgRNAを設計し、次いでsgRNAをpLVXレンチウイルスベクターにクローニングし、且つHEK293T (中国科学院から購入) 細胞中でウイルス粒子を製造した。NCI-H838 (ATCCから購入) 細胞株に対してレンチウイルス感染を行った後、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン (Gibcoから購入、製品番号A1113802) を含む10% (w/w) のウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地で選択的に2週間培養し、H838-LIV1 KO pool細胞株を得た。ヒト抗LIV1抗体 (Ladiratumab、自製) 及びヤギ抗ヒトIgG (H+L) 抗体 (Jackson、製品番号：109605088) で標識し、フローサイトメーターFACS Aria II (BD Biosciencesから購入) でH838-LIV1 KOモノクローナル細胞を96ウェルプレートに選別し、且つ 37°C 、5% (v/v) の CO_2 で培養し、約2週間後に一部のモノクローナルウェルを選択して増殖した。増幅したクローンをフローサイトメトリーによりスクリーニングした。増殖が比較的良く、蛍光強度が比較的低いモノクローナル細胞株を選択して、拡大培養し続けて液体窒素で凍結保存した。

20

【0465】

細胞培養：OVCAR3細胞は、20%のウシ胎児血清 + $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ のウシインスリン + 1%のペニシリン-ストレプトマイシンを含む1640培養液を用い、NCI-H838-hLIV1-KO細胞は、10%のウシ胎児血清 + 1%のペニシリン-ストレプトマイシンを含む1640培養液を用い、2株の細胞とも 37°C 、5%の CO_2 の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

30

【0466】

バイスタンダー効果の検出：被験ADCとLIV-1陽性細胞OVCAR3とをインキュベートした後の上清液をLIV-1陰性細胞NCI-H838-hLIV1-KOに移してインキュベートし続け、且つCell-Titer Glo 試薬を用いて当該上清液のNCI-H838-hLIV1-KO細胞増殖活性に対する影響を検出することにより、ADCのバイスタンダー効果を反映する。OVCAR3細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を10000個の細胞/ $180 \mu\text{L}$ /ウェルに調整し、96ウェルプレートに播種し、 37°C 、5%の CO_2 の条件下で一晩培養した。完全培地でADC濃度を5000 nMに希釈し、且つ5倍勾配希釈して、合計8つの濃度勾配であり、次いで $20 \mu\text{L}$ のADC希釈溶液を96ウェルプレートに移し、即ち、ADCの初期濃度が500 nMであった。96ウェルプレートを 37°C 、5%の CO_2 の条件下で5日間培養した。150 μL のOVCAR3細胞培養プレート中の上清液を吸引し、1日前に播種したNCI-H838-hLIV1-KO細胞プレートに移し (450個の細胞/ $50 \mu\text{L}$ /ウェル)、 37°C 、5%の CO_2 の条件下で5日間培養した。Cell-Titer Glo 試薬を加え、細胞活性を検出した。

40

50

【0467】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれBottom及びTopとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0468】

データ分析：

阻害パーセント（% Inhibition）を計算し、且つ化合物IC₅₀をフィッティングした。

【0469】

阻害パーセント（% Inhibition）= $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$ 。

【0470】

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0471】

実験の結果：

本実験条件下で、被験ADC及びLIV-1陽性細胞OVCA3をインキュベートした後の上清液と、LIV-1陰性細胞NCI-H838-hLIV1-KOとを続けてインキュベートし、Cell-Titer Glo試薬を加えることによりその陰性細胞に対する殺傷を検出し、結果は表28に示す通りであり、本開示の抗LIV1-ADCが比較的良いバイスタンダー効果を有することを示した。

【0472】

【表41】

表28 抗LIV1-ADCのバイスタンダー効果

複合体番号	IC ₅₀ (NCI-H838-hLIV1-KO陰性細胞、 nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L1-19-7	13.7	95.3
ADC-L1-19-P1-7	4.351	97.0
ADC-L1-0-7	48.64	88.0

【0473】

試験例12、抗ROR1-ADCのバイスタンダー効果試験

細胞及び材料：ヒト乳癌細胞株hROR1-MCF7は海南先声再明医薬株式有限公司で構築され、ヒト乳癌細胞株MCF7はATCCから購入し、ウシ血清（Gibco#10099-141C）、DMEM培地（Gibco#11995-065）、ペニシリン-ストレプトマイシン（Gibco#15140-122）及び0.25%のTrypsin-EDTA（Gibco#25200-056）はGibco社（アメリカ）から購入し、96ウェルプレート（Greiner Bio-one#655098）はコーニング社（アメリカ）から購入し、Cell-Titer Glo試薬（Promega#G7568）はプロメガ社（アメリカ）から購入した。

【0474】

細胞培養：hROR1-MCF7細胞とMCF7細胞は、10%のウシ胎児血清+1%のペニシリン-ストレプトマイシンを含むDMEM培養液を用いて、37℃、5%のCO₂の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

【0475】

バイスタンダー効果の検出：被験ADCとROR1陽性細胞hROR1-MCF7とをインキュベートした後の上清液をROR1陰性細胞MCF7に移してインキュベートし続け、且つCell-Titer Glo試薬を用いて当該上清液のMCF7細胞増殖活性に

対する影響を検出することにより、ADCのバイスタンダー効果を反映する。hROR1-MCF7細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を20000個の細胞/180μL/ウェルに調整し、96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のCO₂の条件下で一晩培養した。完全培地でADC濃度を5000nMに希釈し、且つ3倍勾配希釈して、合計8つの濃度勾配であり、次いで20μLのADC希釈溶液を96ウェルプレートに移し、即ち、ADCの初期濃度が500nMであった。96ウェルプレートを37℃、5%のCO₂の条件下で5日間培養した。150μLのhROR1-MCF7細胞培養プレート中の上清液を吸引し、1日前に播種したMCF7細胞プレートに移し（1500個の細胞/50μL/ウェル）、37℃、5%のCO₂の条件下で5日間培養した。Cell-Titer Glo試薬を加え、細胞活性を検出した。

10

【0476】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれBottom及びTopとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0477】

データ分析：

阻害パーセント（% Inhibition）を計算し、且つ化合物IC₅₀をフィッティングした。

【0478】

阻害パーセント（% Inhibition）= $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$ 。

20

【0479】

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0480】

実験の結果：

本実験条件下で、被験ADC及びROR1陽性細胞hROR1-MCF7をインキュベートした後の上清液と、ROR1陰性細胞MCF7とを続けてインキュベートし、Cell-Titer Glo試薬を加えることによりその陰性細胞に対する殺傷を検出し、結果は表29に示す通りであり、本開示の抗ROR1-ADCが比較的良好なバイスタンダー効果を有することを示した。

30

【0481】

【表42】

表29 抗ROR1-ADCのバイスタンダー効果

複合体番号	IC ₅₀ (陰性細胞、nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L1-19-8	0.03	56.83
ADC-L1-19-P1-8	0.05	53.62
ADC-L1-19-9	0.10	57.76
ADC-L1-19-P1-9	0.07	53.70
ADC-L1-19-10	0.02	61.37
ADC-L1-19-P1-10	0.03	57.86

40

【0482】

試験例13、抗HER2-ADCのバイスタンダー効果試験

細胞及び材料：ヒト乳癌細胞株SKBR3はATCCから購入し、ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H2171はATCCから購入し、ウシ血清（Gibco#10099-141C）、McCoy's 5a培地（Gibco#16600-082）、1640培地（

50

G i b c o # A 1 0 4 9 1 - 0 1)、ペニシリンーストレプトマイシン (G i b c o # 1 5 1 4 0 - 1 2 2) 及び 0 . 2 5 % の T r y p s i n - E D T A (G i b c o # 2 5 2 0 0 - 0 5 6) は G i b c o 社 (ア メ リ カ) から購入し、96 ウェルプレート (G r e i n e r B i o - o n e # 6 5 5 0 9 8) はコーニング社 (ア メ リ カ) から購入し、C e l l - T i t e r G l o 試薬 (P r o m e g a # G 7 5 6 8) はプロメガ社 (ア メ リ カ) から購入した。

【 0 4 8 3 】

細胞培養：S K B R 3 細胞は、10 % のウシ胎児血清 + 1 % のペニシリンーストレプトマイシンを含む M c C o y ' s 5 a 培養液を用い、N C I - H 2 1 7 1 細胞は、10 % のウシ胎児血清 + 1 % のペニシリンーストレプトマイシンを含む 1 6 4 0 培養液を用い、2 株の細胞とも 3 7 ° C、5 % の C O ₂ の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

10

【 0 4 8 4 】

バイスタンダー効果の検出：A D C と H E R 2 陽性細胞 S K B R 3 とをインキュベートした後の上清液を H E R 2 陰性細胞 N C I - H 2 1 7 1 に移してインキュベートし続け、且つ C e l l - T i t e r G l o 試薬を用いて当該上清液の N C I - H 2 1 7 1 細胞増殖活性に対する影響を検出することにより、A D C のバイスタンダー効果を反映する。S K B R 3 細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を 1 0 0 0 0 個の細胞 / 1 8 0 μ L / ウェルに調整し、96 ウェルプレートに播種し、3 7 ° C、5 % の C O ₂ の条件下で一晩培養した。完全培地で A D C 濃度を 5 0 0 0 n M に希釈し、且つ 3 倍勾配希釈して、合計 8 つの濃度勾配であり、次いで 2 0 μ L の A D C 希釈溶液を 96 ウェルプレートに移し、即ち、A D C の初期濃度が 5 0 0 n M であった。96 ウェルプレートを 3 7 ° C、5 % の C O ₂ の条件下で 3 日間培養した。1 5 0 μ L の S K B R 3 細胞培養プレート中の上清液を吸引し、1 日前に播種した N C I - H 2 1 7 1 細胞プレートに移し (6 0 0 0 個の細胞 / 5 0 μ L / ウェル)、3 7 ° C、5 % の C O ₂ の条件下で 5 日間培養した。C e l l - T i t e r G l o 試薬を加え、細胞活性を検出した。

20

【 0 4 8 5 】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれ B o t t o m 及び T o p として設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

30

【 0 4 8 6 】

データ分析：

阻害パーセント (% I n h i b i t i o n) を計算し、且つ化合物 I C ₅₀ をフィッティングした。

【 0 4 8 7 】

阻害パーセント (% I n h i b i t i o n) = 1 - 1 0 0 % × (S i g n a l - B o t t o m) / (T o p - B o t t o m) 。

【 0 4 8 8 】

S i g n a l は実験群のシグナル値を指し、B o t t o m は陰性対照群の平均シグナル値を指し、T o p は陽性対照群の平均シグナル値を指す。

40

【 0 4 8 9 】

実験の結果：

本実験条件下で、被験 A D C 及び H E R 2 陽性細胞 S K B R 3 をインキュベートした後の上清液と、H E R 2 陰性細胞 N C I - H 2 1 7 1 とを続けてインキュベートし、C e l l - T i t e r G l o 試薬を加えることによりその陰性細胞に対する殺傷を検出し、結果は表 3 0 に示す通りであり、本開示の抗 H E R 2 - A D C が比較的良いバイスタンダー効果を有することを示した。

【 0 4 9 0 】

50

【表 4 3】

表 3 0 抗HER2-ADCのバイスタンダー効果

複合体番号	IC ₅₀ (陰性細胞、nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L1-0-11	1.90	89.17
ADC-L1-19-11	0.16	81.43
ADC-L1-19-P1-11	0.12	84.55
ADC-L1-0-2	3.42	99.14
ADC-L1-19-2	0.15	81.33
ADC-L1-19-P1-2	0.17	86.51

10

【0491】

試験例14、抗CDH6-ADCのバイスタンダー効果試験

細胞及び材料：ヒト卵巣癌細胞株OVCA R3はATCCから購入し、ヒト卵巣癌細胞株SKOV3はATCCから購入し、ウシ血清 (Gibco #10099-141C)、1640培地 (Gibco #A10491-01)、McCoy's 5a培地 (Gibco #16600-082)、ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco #15140-122) 及び0.25%のTrypsin-EDTA (Gibco #25200-056) はGibco社 (アメリカ) から購入し、ウシインスリン (Solarbio #I8040) はSolarbio社 (アメリカ) から購入し、96ウェルプレート (Greiner Bio-one #655098) はコーニング社 (アメリカ) から購入し、Cell-Titer Glo試薬 (Promega #G7568) はプロメガ社 (アメリカ) から購入した。

20

【0492】

細胞培養：OVCA R3細胞は、20%のウシ胎児血清+2µg/mLのウシインスリン+1%のペニシリン-ストレプトマイシンを含む1640培養液を用い、SKOV3細胞は、10%のウシ胎児血清+1%のペニシリン-ストレプトマイシンを含むMcCoy's 5a培養液を用い、2株の細胞とも37℃、5%のCO₂の条件下で培養し、対数増殖期にある細胞を実験に使用できる。

【0493】

バイスタンダー効果の検出：ADCとCDH6陽性細胞OVCA R3とをインキュベートした後の上清液をCDH6陰性細胞SKOV3に移してインキュベートし続け、且つCell-Titer Glo試薬を用いて当該上清液のSKOV3細胞増殖活性に対する影響を検出することにより、ADCのバイスタンダー効果を反映する。OVCA R3細胞を細胞培養フラスコ内から消化して吹き散らし、対応する新鮮培地で再懸濁し、細胞密度を20000個の細胞/180µL/ウェルに調整し、96ウェルプレートに播種し、37℃、5%のCO₂の条件下で一晩培養した。完全培地でADC濃度を4500nMに希釈し、且つ3倍勾配希釈して、合計8つの濃度勾配であり、次いで20µLのADC希釈溶液を96ウェルプレートに移し、即ち、ADCの初期濃度が450nMであった。96ウェルプレートを37℃、5%のCO₂の条件下で5日間培養した。150µLのOVCA R3細胞培養プレート中の上清液を吸引し、1日前に播種したSKOV3細胞プレートに移し (700個の細胞/50µL/ウェル)、37℃、5%のCO₂の条件下で7日間培養した。Cell-Titer Glo試薬を加え、細胞活性を検出した。

30

40

【0494】

また、陰性対照群及び陽性対照群を、それぞれBottom及びTopとして設定した。陰性対照群は細胞を加えず、同じ体積の培地のみを加え、その他の操作は実験群と一致し、陽性対照群は被験薬物を加えず、その他の操作は実験群と一致した。

【0495】

データ分析：

阻害パーセント (% Inhibition) を計算し、且つ化合物IC₅₀をフィッテ

50

イングした。

【0496】

阻害パーセント (% Inhibition) = $1 - 100\% \times (\text{Signal} - \text{Bottom}) / (\text{Top} - \text{Bottom})$ 。

【0497】

Signalは実験群のシグナル値を指し、Bottomは陰性対照群の平均シグナル値を指し、Topは陽性対照群の平均シグナル値を指す。

【0498】

実験の結果：

本実験条件下で、被験ADC及びCDH6陽性細胞OVCA R3をインキュベートした後の上清液と、CDH6陰性細胞SKOV3とを続けてインキュベートし、Cell-Counter Glo試薬を加えることによりその陰性細胞に対する殺傷を検出し、結果は表31に示す通りであり、本開示の抗CDH6-ADCが比較的良いバイスタンダー効果を示すことを示した。

【0499】

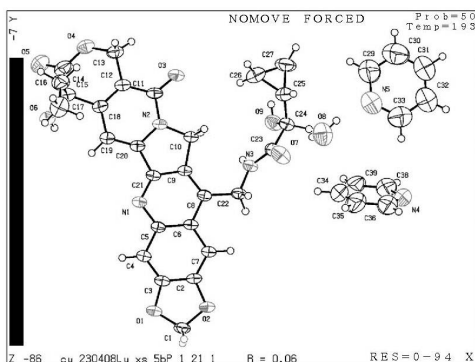
【表44】

表31 抗CDH6-ADCのバイスタンダー効果

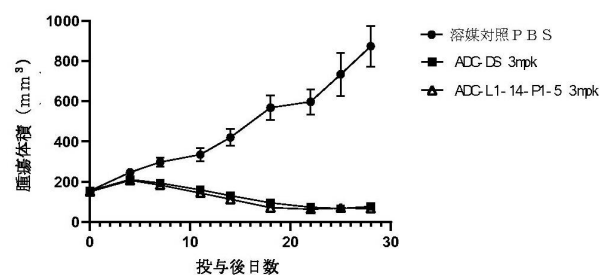
複合体番号	IC ₅₀ (陰性細胞、nM)	最大阻害率 (%)
ADC-L1-0-3	4.70	99.76
ADC-L1-19-3	1.39	102.7
ADC-L1-19-P1-3	1.37	105.4
ADC-L1-0-6	3.76	100.9
ADC-L1-19-6	2.21	104
ADC-L1-19-P1-6	1.80	104.9
ADC-L1-0-5	12.74	100.9
ADC-L1-19-5	1.01	103.1

【図面】

【図1】



【図2】



10

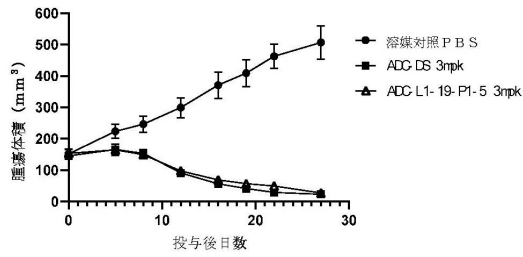
20

30

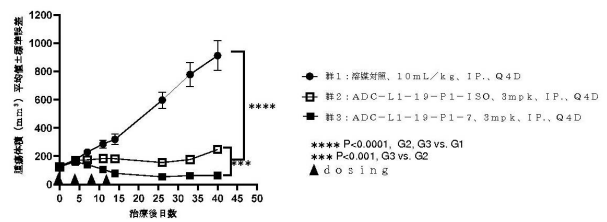
40

50

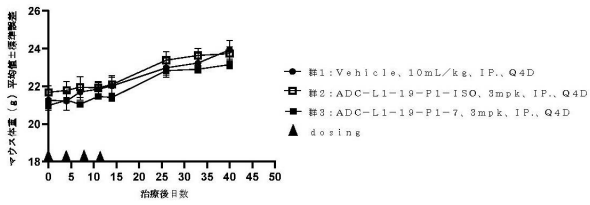
【図 3】



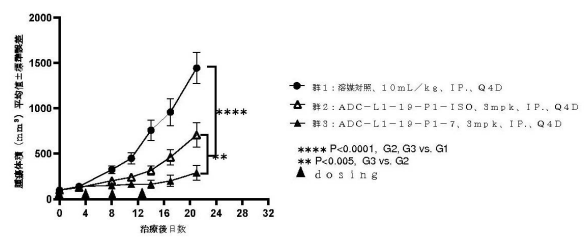
【図 4】



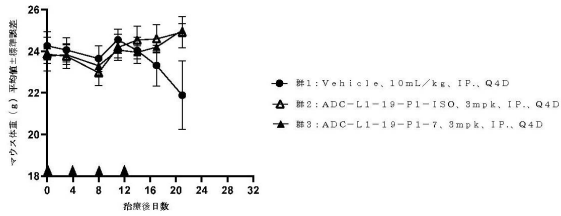
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

2025516381000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/093503
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i; C07D491/22(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i 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) IPC: A61K A61P C07D C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方, WANFANG; ISI Web of Science; 读秀学术, DUXIU ACADEMIC; Springer; STNext; EMBL; NCBI; 先声再明医药有限公司, 喜树碱, 抗体, 偶联物, 结构式检索, search for structural formula, 序列检索, sequence search, Camptothecin, antibody, conjugate, ADC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112512592 A (SEAGEN INC.) 16 March 2021 (2021-03-16) description, paragraphs [0120]-[0124], [0136], [0264], [0265], [0277], [0495], [0507], [1014]-[1016]	1-9, 11, 12, 17-24, 29-31
A	LI, Wei et al. "Synthesis and Evaluation of Camptothecin Antibody-Drug Conjugates" <i>ACS Medicinal Chemistry Letters</i> , 06 September 2019 (2019-09-06), p. 1386, abstract	1-31
A	WO 2021067820 A1 (SEAGEN INC.) 08 April 2021 (2021-04-08) description, paragraphs [0006]-[0010]	1-31
A	US 2021101982 A1 (SEATTLE GENETICS INC.) 08 April 2021 (2021-04-08) description, paragraphs [0006]-[0046]	1-31
A	WO 2021067861 A1 (SEAGEN INC.) 08 April 2021 (2021-04-08) claims 1-75, description, paragraph [0323]	1-31
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 15 August 2023		Date of mailing of the international search report 24 August 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/093503

Box No. I 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.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/093503

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.: **32, 33**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 32 relates to a method for treating a tumor in a subject in need; and the subject matter of claim 33 relates to the use for the treatment of a tumor in a subject. However, the above-mentioned method or use has an ultimate purpose of treating a disease in a living animal body, which falls within the scope of methods for diagnosing and treating diseases (PCT Rule 39.1(4)).
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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/093503

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112512592	A	16 March 2021	JP	2021527040	A	11 October 2021
				EP	3801633	A1	14 April 2021
				MX	2020013169	A	29 March 2021
				IL	278990	A	31 January 2021
				CA	3101866	A1	12 December 2019
				AU	2019282767	A1	07 January 2021
				WO	2019236954	A1	12 December 2019
				TW	202015740	A	01 May 2020
				BR	112020024915	A2	09 March 2021
				SG	11202011915	TA	30 December 2020
				US	2023036256	A1	02 February 2023
				KR	20210053871	A	12 May 2021
				None			
WO	2021067820	A1	08 April 2021	None			
US	2021101982	A1	08 April 2021	None			
WO	2021067861	A1	08 April 2021	KR	20220079606	A	13 June 2022
				JP	2022550851	A	05 December 2022
				EP	4037717	A1	10 August 2022
				IL	291686	A	01 May 2022
				CA	3152316	A1	08 April 2021
				AU	2020356955	A1	14 April 2022

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/093503
A. 主题的分类 A61K 47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i; C07D491/22(2006.01)i; C07K16/28(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: A61K A61P C07D C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方; ISI Web of Science; 读秀学术; Springer; STNet; EMBL; NCBI; 先声再明医药有限公司, 喜树碱, 抗体, 偶联物, 结构式检索, 序列检索, Camptothecin, antibody, conjugate, ADC		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 112512592 A (西根公司) 2021年3月16日 (2021 - 03 - 16) 说明书第[0120]-[0124]、[0136]、[0264]、[0265]、[0277]、[0495]、[0507]、 [1014]-[1016]段	1-9、11、12、 17-24、29-31
A	Wei Li 等. "Synthesis and Evaluation of Camptothecin Antibody-Drug Conjugates" ACS Medicinal Chemistry Letters, 2019年9月6日 (2019 - 09 - 06), 第1386页摘要	1-31
A	WO 2021067820 A1 (SEAGEN INC) 2021年4月8日 (2021 - 04 - 08) 说明书第[0006]-[0010]段	1-31
A	US 2021101982 A1 (SEATTLE GENETICS INC) 2021年4月8日 (2021 - 04 - 08) 说明书第[0006]-[0046]段	1-31
A	WO 2021067861 A1 (SEAGEN INC) 2021年4月8日 (2021 - 04 - 08) 权利要求1-75、说明书第[0323]段	1-31
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年8月15日		国际检索报告邮寄日期 2023年8月24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		受权官员 杨凤娇 电话号码 (+86) 0512-88995733

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/093503

第1栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)
1	5'-GGG-3'
2	5'-GGG-3'
3	5'-GGG-3'
4	5'-GGG-3'
5	5'-GGG-3'
6	5'-GGG-3'
7	5'-GGG-3'
8	5'-GGG-3'
9	5'-GGG-3'
10	5'-GGG-3'
11	5'-GGG-3'
12	5'-GGG-3'
13	5'-GGG-3'
14	5'-GGG-3'
15	5'-GGG-3'
16	5'-GGG-3'
17	5'-GGG-3'
18	5'-GGG-3'
19	5'-GGG-3'
20	5'-GGG-3'
21	5'-GGG-3'
22	5'-GGG-3'
23	5'-GGG-3'
24	5'-GGG-3'
25	5'-GGG-3'
26	5'-GGG-3'
27	5'-GGG-3'
28	5'-GGG-3'
29	5'-GGG-3'
30	5'-GGG-3'
31	5'-GGG-3'
32	5'-GGG-3'
33	5'-GGG-3'
34	5'-GGG-3'
35	5'-GGG-3'
36	5'-GGG-3'
37	5'-GGG-3'
38	5'-GGG-3'
39	5'-GGG-3'
40	5'-GGG-3'
41	5'-GGG-3'
42	5'-GGG-3'
43	5'-GGG-3'
44	5'-GGG-3'
45	5'-GGG-3'
46	5'-GGG-3'
47	5'-GGG-3'
48	5'-GGG-3'
49	5'-GGG-3'
50	5'-GGG-3'
51	5'-GGG-3'
52	5'-GGG-3'
53	5'-GGG-3'
54	5'-GGG-3'
55	5'-GGG-3'
56	5'-GGG-3'
57	5'-GGG-3'
58	5'-GGG-3'
59	5'-GGG-3'
60	5'-GGG-3'
61	5'-GGG-3'
62	5'-GGG-3'
63	5'-GGG-3'
64	5'-GGG-3'
65	5'-GGG-3'
66	5'-GGG-3'
67	5'-GGG-3'
68	5'-GGG-3'
69	5'-GGG-3'
70	5'-GGG-3'
71	5'-GGG-3'
72	5'-GGG-3'
73	5'-GGG-3'
74	5'-GGG-3'
75	5'-GGG-3'
76	5'-GGG-3'
77	5'-GGG-3'
78	5'-GGG-3'
79	5'-GGG-3'
80	5'-GGG-3'
81	5'-GGG-3'
82	5'-GGG-3'
83	5'-GGG-3'
84	5'-GGG-3'
85	5'-GGG-3'
86	5'-GGG-3'
87	5'-GGG-3'
88	5'-GGG-3'
89	5'-GGG-3'
90	5'-GGG-3'
91	5'-GGG-3'
92	5'-GGG-3'
93	5'-GGG-3'
94	5'-GGG-3'
95	5'-GGG-3'
96	5'-GGG-3'
97	5'-GGG-3'
98	5'-GGG-3'
99	5'-GGG-3'
100	5'-GGG-3'

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是基于下列序列表进行的：
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的；
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见：

10

20

30

40

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/093503
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下： 1. ☒ 权利要求： 32、33 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： 权利要求32主题涉及治疗有需要的受试者的肿瘤的方法；权利要求33主题涉及用于治疗受试者的肿瘤的用途。但上述方法或用途是以治疗有生命的动物体的疾病为最终目的，属于PCT细则39.1(4)条规定的疾病诊断和治疗方法范畴。 2. ☐ 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说： 3. ☐ 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。		

10

20

30

40

50

国际申请号

PCT/CN2023/093503

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112512592	A	2021年3月16日	JP	2021527040	A	2021年10月11日
				EP	3801633	A1	2021年4月14日
				MX	2020013169	A	2021年3月29日
				IL	278990	A	2021年1月31日
				CA	3101866	A1	2019年12月12日
				AU	2019282767	A1	2021年1月7日
				WO	2019236954	A1	2019年12月12日
				TW	202015740	A	2020年5月1日
				BR	112020024915	A2	2021年3月9日
				SG	112020111915	TA	2020年12月30日
				US	2023036256	A1	2023年2月2日
				KR	20210053871	A	2021年5月12日
WO	2021067820	A1	2021年4月8日	无			
US	2021101982	A1	2021年4月8日	无			
WO	2021067861	A1	2021年4月8日	KR	20220079606	A	2022年6月13日
				JP	2022550851	A	2022年12月5日
				EP	4037717	A1	2022年8月10日
				IL	291686	A	2022年5月1日
				CA	3152316	A1	2021年4月8日
				AU	2020356955	A1	2022年4月14日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 0 7 K	5/103(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 0 7 K	5/00 (2006.01)	C 0 7 K	5/103	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	5/00	
		C 0 7 K	16/28	
(32)優先日	令和5年4月14日(2023.4.14)			
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW ーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	リー ジェン 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	チェン シャンヤン 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	チャイ シャオジュアン 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	ユー ジーヨン 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	タン フォン 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	カオ ズオシャオ 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
(72)発明者	タン レンホン 中華人民共和国 2 0 1 3 1 8 シャンハイ プードン ニュー ディストリクト フーロンフワ ロード レーン 1 1 8			
F ターム (参考)	4C076 AA95 CC27 CC41 DD60 EE41 EE59 FF70 4C085 AA14 AA21 BB01 CC23 EE01 4C086 AA01 AA02 AA03 CB22 NA13 ZB26 4H045 AA11 AA30 BA10 BA11 BA12 BA13 BA14 BA50 CA40 DA75 EA20			