

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日

2019 年 4 月 4 日 (04.04.2019)



(10) 国際公開番号

W O 2019/065964 A 1

(51) 国際特許分類：

C12N 15/06 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/5513 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/036252

(22) 国際出願日： 2018 年 9 月 28 日 (28.09.2018)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：

特願 2017-190713 2017 年 9 月 29 日 (29.09.2017) JP

(71) 出願人：第一三共株式会社 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP] ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者：戸田 成洋 (TODA Narihiro) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 太田 悠介 (OTA Yusuke) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 土居 史尚 (DOI Fuminao) ; 〒1038426 東

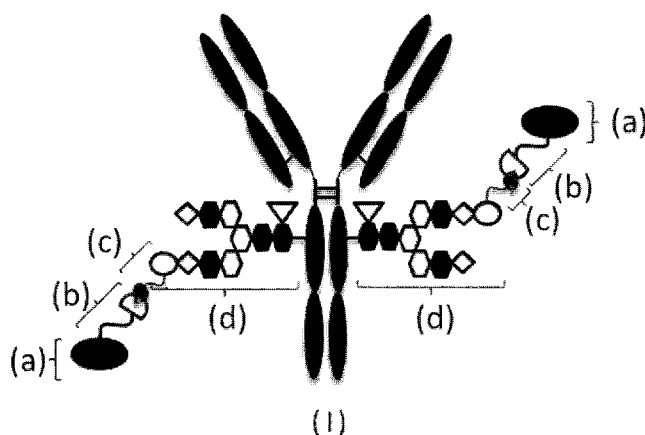
京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 目黒 正規 (MEGURO Masaki) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 早川 市郎 (HAYAKAWA Ichiro) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 蘆田 真二 (ASHIDA Shinji) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 益田 剛 (MASUDA Takeshi) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 中田 隆 (NAKADA Takashi) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 岩本 充広 (IWAMOTO Mitsuhiro) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 原田 直弥 (HARADA Naoya) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 寺内 智子 (TERAUCHI Tomoko) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 岡 篤大祐 (OKAJIMA Daisuke) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 第一三共株

(54) Title: ANTIBODY-PYRROLOBENZODIAZEPINE

DERIVATIVE

CONJUGATE

(54) 発明の名称：抗体ーピロロベンゾジアゼピン誘導体コンジュゲート



(57) Abstract: Provided are: a novel antibody -pyrrolobenzodiazepine derivative; a novel antibody -pyrrolobenzodiazepine derivative conjugate using the same; and novel CLDN6 antibody and/or CLDN9 antibody.

(57) 要約：本発明は新規な抗体ーピロロベンゾジアゼピン誘導体及びそれを用いた新規な抗体ーピロロベンゾジアゼピン誘導体コンジュゲート、並びに新規なCLDN6及び／又はCLDN9抗体を提供する。

式会社内 Tokyo (JP). 中村 健介 (NAKAMURA Kensuke) ; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 内田 宏昭 (UCHIDA Hiroaki) ; 〒1920392 東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学内 Tokyo (JP). 濱田 洋文 (HAMADA Hirofumi) ; 〒1920392 東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人 :特許業務法人川口国際特許事務所 (KAWAGUTI & PARTNERS) ; 〒1690074 東京都新宿区北新宿二丁目21番1号新宿フロンタワ_20階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, 固 ,MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

抗体—ピロロベンゾジアゼピン誘導体コンジュゲート

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍細胞を標的にできる抗体とピロロベンゾジアゼピン誘導体とをリンカー構造部分を介して結合させた、抗腫瘍薬として有用な抗体—薬物コンジュゲートに関する。

背景技術

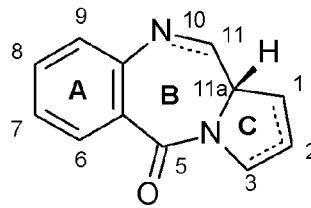
[0002] 抗体—薬物コンジュゲート (Antibody—Drug Conjugate ;ADC) は、癌細胞表面に発現している抗原に結合し、その結合によって抗原を細胞内に内在化できる抗体に、細胞傷害活性を有する薬物を結合させたものである。ADCは、癌細胞に効率的に薬物を送達できることによって、癌細胞内に薬物を蓄積させ、癌細胞を死滅させることが期待できる。

ADCとして例えば、抗CD30モノクローナル抗体にモノメチルアウリスタチンEを結合させたアドセトリス (商標) (プレントキシマブ ベドチン) がホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として認可されている。また、抗HER2モノクローナル抗体にエムタンシンを結合させたカドサイラ (商標) (トラスツズマブ エムタンシン) がHER2陽性の進行、再発乳癌の治療に用いられている。

ADCに結合させる薬物として有用なものの一つにピロロベンゾジアゼピン (PBD) が挙げられる。PBDはDNA小溝のPuGpu配列などに結合することによって細胞毒性を示す。天然由来のPBDであるanthramycinは1965年に初めて発見され、それ以降様々な天然由来、またその類縁体のPBDが発見された (非特許文献1〜4)。

PBDの一般的な構造式は下式

[化 1]



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

PBDは二量体構造にすることにより、飛躍的に細胞毒性が向上することが知られており（非特許文献5、6）、二量体PBDをADC化したものも種々報告されている（特許文献1～13）。しかしながら、C2位においてスピロ環を有するPBD又はそのADC体は知られていない。

ヒトCLDN6（Claudin-6、以下hCLDN6と表記する）は、Claudin（CLDN）ファミリー蛋白質の一種で、220アミノ酸残基からなる4回膜貫通型の膜蛋白質である。以前より、hCLDN6は一部の癌において過剰発現し、魅力的な癌治療標的であることが示唆されている（非特許文献7～9）。また、CLDNファミリー蛋白質はエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、ターンオーバー時間が短いファミリー蛋白質も報告されていることから（非特許文献10）、抗体薬物複合体（ADC）の標的に適すると考えられる。

このような癌との関連性を示唆する情報から、これまでにhCLDN6を特異的に認識するモノクローナル抗体が発見され（特許文献14、15）、CLDN6特異的なモノクローナル抗体にチューブリン重合阻害薬のモノメチルオーリスチンE（MMAE）やメイタンシノイド（PM1）を結合させたADCが報告されている（非特許文献11）。

一方、複数のCLDNファミリーを認識する抗体は治療の適応範囲を広げられる可能性があるとしてCLDN6とCLDN9を認識する抗体（特許文献16）に強力な殺細胞効果を有するピロロベンゾジアゼピン（PBD）を結合させたADCも開示されている（特許文献17）。

しかしながら、それらの活性の強さはまだ十分ではなく、hCLDN6を治療標的とする未充足医療ニーズが存在している。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1 : 国際公開第2013/ 173496 号
特許文献2 : 国際公開第2014/1 30879 号
特許文献3 : 国際公開第2017/004330 号
特許文献4 : 国際公開第2017/004025 号
特許文献5 : 国際公開第2017Z020972 号
特許文献6 : 国際公開第2016Z036804 号
特許文献7 : 国際公開第2015/0951 24号
特許文献8 : 国際公開第2015/052322 号
特許文献9 : 国際公開第2015/052534 号
特許文献10 : 国際公開第2016Z1 15191号
特許文献11 : 国際公開第2015Z052321 号
特許文献12 : 国際公開第2015Z031 693号
特許文献13 : 国際公開第2011/ 130613号
特許文献14 : 国際公開第2009Z087978 号
特許文献15 : 国際公開第2011/057788 号
特許文献16 : 国際公開第2015Z069794 号
特許文献17 : 国際公開第2017Z0961 63号

非特許文献

- [0004] 非特許文献1 : Julia Mantaj , et al., Angewandte Chemie International Edition 2016, 55, 2-29
非特許文献2 : Dyeison Antonow. et al., Chemical Reviews 2010, 111, 2815-2864
非特許文献3 : In Antibiotics III. Springer Verlag, New York, pp .3-11

非特許文献4: Accounts of Chemical Research 1986, 19, 230

非特許文献5: Journal of the American Chemical Society 1992, 114, 4939

非特許文献6: Journal of Organic Chemistry 1996, 61, 8141

非特許文献7: BMC Cancer, 2006, 6, 186.

非特許文献8: Histopathology, 2012, 61, 1043-1056.

非特許文献9: Int J Cancer, 2014, 135, 2206-2214.

非特許文献10: J Membrane Biol, 2004, 199, 29-38.

非特許文献11: 14th Annual Meet Cancer Immunother (CMT) (May 10-12, Mainz) 2016, Abst 185

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、新規な抗体－ピロロベンゾジアゼピン（PBD）誘導体コンジュゲート及び新規なピロロベンゾジアゼピン（PBD）誘導体を提供するものである。

本発明は、新規な抗CLDN6抗体を提供するものである。

また、本発明は、抗腫瘍活性を有する前記抗体－PBD誘導体コンジュゲート、PBD誘導体又は抗CLDN6抗体を含有する医薬組成物を提供するものである。

さらに、本発明は、前記抗体－PBD誘導体コンジュゲート、PBD誘導体又は抗CLDN6抗体を用いた癌の治療方法を提供するものである。

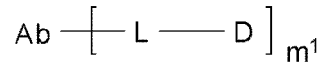
課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、鋭意検討した結果、新規な抗体－ピロロベンゾジアゼピン（PBD）誘導体コンジュゲートが、強い抗腫瘍活性を有することを見出し、本発明を完成させた。

すなわち本願発明は、以下に関するものである。

[0007] [1] 次式：

[化2]



(式中、 m^1 は1から10の整数、好ましくは、2から8の整数)を示し、

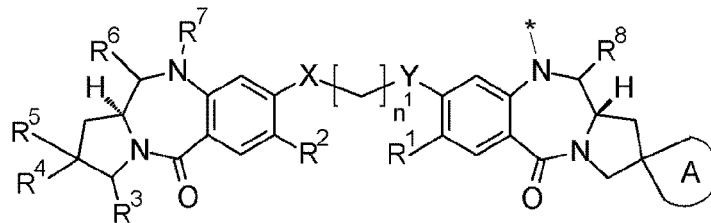
Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体の糖鎖はリモデリングされていてもよく、

Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、

Abはそのアミノ酸残基から直接Lに結合するか、Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からLに結合していてもよく、

Dは、次式で示される薬物を示し、

[化3]



式中、アステリスクはLと結合していることを示し、

n_1 は、2から8の整数を示し、

Aは、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環又は3～5員の飽和複素環を示し、

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して、 c_1 ～ C_6 アルコキシ基、 c_1 ～ C_6 アルキル基、水素原子、水酸基、チオール基、 c_1 ～ C_6 アルキルチオ基、ハロゲン原子又は $-NR' R'$ を示し、

ここで、 R' 及び R' は、それぞれ独立して、水素原子又は c_1 ～ C_6 アルキル基を示し、

R^3 、 R^4 及び R^5 は、下記 (i) ～ (iii) から選択され、

(i) R^3 及び R^4 が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、

おは、群1から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリ

ール基もしくはヘテロアリール基、又は群2から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基を示す、

(ii) おは、水素原子を示し、

R^4 及び R^5 が、 R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、3〜5員の飽和炭化水素環もしくは3〜5員の飽和複素環又は $CH_2=$ を形成する、

(iii) R^3 、 R^4 及び R^5 が、 R^3 が結合している炭素原子並びに R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、群3から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環を形成する、

R^6 及び R^7 は、共に水素原子を示すか、 R^6 及び R^7 と一緒にあって、イミン結合($C=N$)であることを示し、

R^8 は、水酸基又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基であり、

X及びYは、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子又は硫黄原子であり、

群1は、a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルコキシ基、

b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-C(=NR')-NR'$ 、 $-C(=NR')-NR'R''$ 、及び $-C(=NR')-NR'R''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基、

c) ハロゲン原子、

d) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、

e) C_1 〜 C_6 アルキルチオ基、

f) $-NR'R''$ 、

g) $-C(=NR')-NR''R'''$ 、

h) $-NHC(=NR')-NR''R'''$ 、

i) $-NHCOR'$ 、又は

j) 水酸基を示し、

ここで、 R' 及び R'' は、前で定義した通りであり、 R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_6 アルキル基を示し、

群2は、ハロゲン原子、水酸基、又は C_1 〜 C_6 アルコキシ基を示し、並びに、

群3は、ハロゲン原子、又は1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基もしくは C_1 〜 C_6 アルコキシ基を示す)

で示される抗体—薬物コンジュゲート。

[2] Aが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^3 及び R^4 が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、

R^5 が、群4から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群5から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基であることを示し、

X及びYが酸素原子であり、

群4は、a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルコキシ基、

b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')-NR''R'''$ 、及び $-NHC(=NR')-NR''R'''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基、

c) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、

d) $-C(=NR'')-NR''R'''$ 、

e) $-NHC(=NR'')-NR''R'''$ 、又は

f) 水酸基を示し、

ここで、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基を示し、並びに、

群5は、ハロゲン原子、水酸基、又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示す、[1]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[3] Aが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

おが、水素原子を示し、

R^4 及び R^5 が、 R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、3～5員の飽和炭化水素環又は $=CH_2$ を形成し、並びに、

X及びYが酸素原子である、[1]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[4] Aが、1～2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環を示し、

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、 C_1 ～ C_3 アルコキシ基を示し、

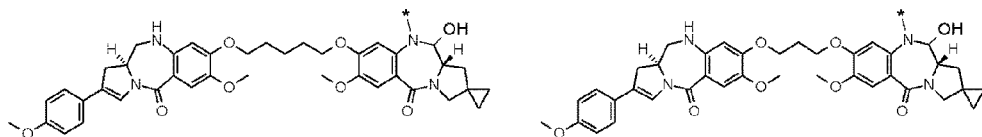
R^3 、 R^4 及びおが、 R^3 が結合している炭素原子並びに R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、群6から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環を形成し、

X及びYが酸素原子であり、並びに、

群6は、ハロゲン原子、又は1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 ～ C_3 アルキル基もしくは C_1 ～ C_3 アルコキシ基を示す、[1]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[5] Dが、以下の2式のいずれかで示され、

[化4]



式中、アステリスクはLと結合していることを示す、[1]又は[2]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[6] Dが、以下の2式のいずれかで示され、

[化5]



式中、アステリスクはLと結合していることを示す、[1]又は[3]に記載

の抗体—薬物コンジュゲート。

[7] L_g 、 $-L_b-L_a-L_p-NH-B-CH_2-O(C=O)-*$ で示され、

式中、アステリスクは、Dと結合していることを示し、

Bは、フェニル基又はヘテロアリール基を示し、

L_p は、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示し、

L_a は、以下の群：

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、及び、 $-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$

OK

から選択されるいずれか一つを示し、

n^2 は1〜3の整数、 n^3 は1〜5の整数、 n^4 は0〜2の整数を示し、

L_b は、 L_a とAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサーを示す、[1]〜[6]のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[8] Bが、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、2,5-チエニル基から選択されるいずれか一つである、[7]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[9] Bが、1,4-フェニル基である、[8]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[10] L_p が、2から7個のアミノ酸で構成されるアミノ酸残基である、[7]〜[9]のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[11] L_p が、グリシン、パリン、アラニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、イソロイシン、プロリン、シトルリン、ロイシン、セリン、リシン及びアスパラギン酸から選択されるアミノ酸からなるアミノ酸残基である、[7]〜[10]のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[12] L_p が、以下の群：

-GGVA-、-GG-(D)-VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D)-P

I-、及び、-GGPL-から選択される、[7]～[11]のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[13] Laが、以下の群：

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

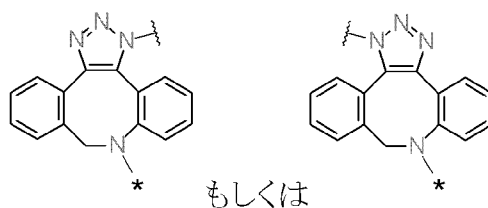
-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、及び、-OC(=O)-

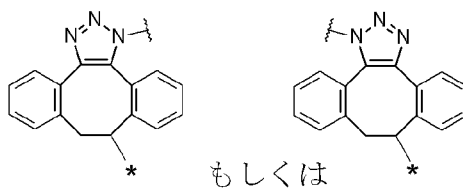
から選択される、[7]～[12]のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[14] Lbが、次式で示され、

[化6]

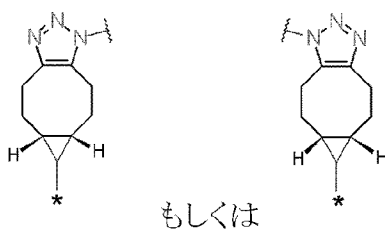


[化7]



、又は、

[化8]



上記で示されるLbの構造式において、アステリスクはLaと結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、[7] ～ [13] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[15] Lが、 $\text{Lb-La-L}_p\text{-NH-B-CH}_2\text{-O-C(=O)-}$ *

で示され、

式中、Bは、1,4-フエニル基であり、

Lpは、以下の群：

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、及び、-GPL-、

から選択されるいずれか一つを示し、

Laは、以下の群：

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

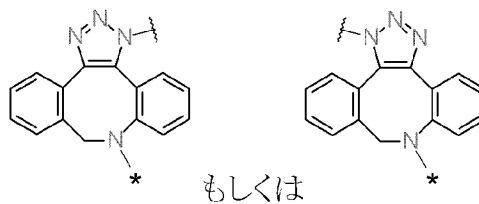
-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、及び、-OC(=O)-、

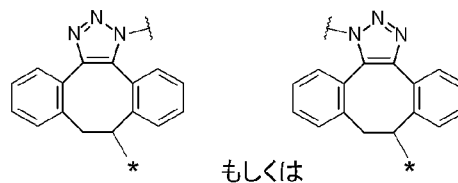
から選択されるいずれか一つを示し、並びに、

Lbは、次式で示され、

[化9]

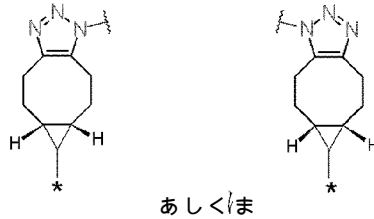


[化10]



、又は、

[化 11]



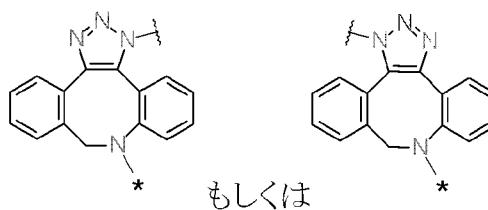
ここで、上記で示されるLbの構造式において、アステリスクはLaと結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、[7] ～ [14] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[16] しが、以下の群：

- Z₁ - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GG- (D-) VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) - (CH₂CH₂)₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPI-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGFG-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVCit-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVK-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPL-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂-CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- V - C(=O) -CH₂CH₂-NH-C(=O) - (CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、
- Z₂-OC(=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、及び
- Z₃-CH₂-OC(=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) - から選択され、

ここで、Z_iは、以下の構造式：

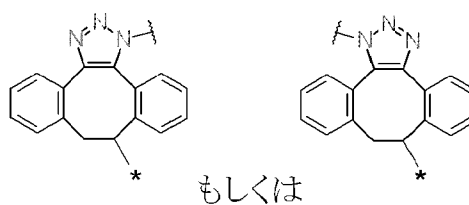
[化 12]



を示し、

 Z^2 は、以下の構造式：

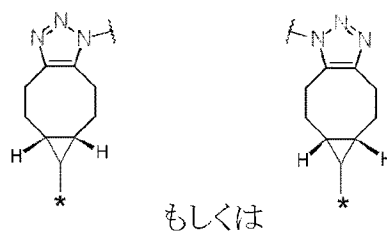
[化 13]



を示し、

だは、以下の構造式：

[化 14]



を示し、

ここで、 Z 、 Z^2 及び Z^3 の構造式において、アステリスクは L_a と結合していることを示し、波線は Ab の糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示し、並びに、

B は、1,4-フェニル基を示す、[7] ～ [15] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[17] L が、以下の群：

- Z_L C(=O) -CH₂CH₂- C(=O)-GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、

- Z_L C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) -、

$-Z'-C(=O) - (CH_2CH_2)_2 - C(=O) - VA-NH-B-CH_2OC(=O) -$ 、

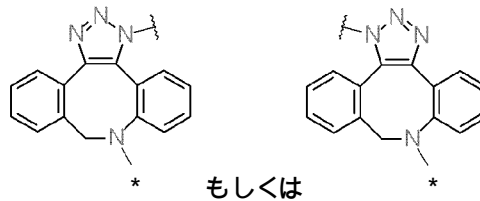
$-Zi - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - GGVCit-NH-B-CH_2OC(=O) -$ 、 $-Z'-C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)_2 - C(=O) - VA-NH-B-CH_2OC(=O) -$ 、

$-Z'-C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)_2 - CH_2 - C(=O) - VA-NH-B-CH_2OC(=O) -$ 、及び

$-Z'-C(=O) - CH_2CH_2 - NH - C(=O) - (CH_2CH_2)_4 - CH_2CH_2 - C(=O) - VA-NH-B-CH_2OC(=O) -$ から選択され、

ここで、Bは1,4-フェニル基であり、Z'は以下の構造式：

[化15]



を示し、

ここで、Ziの構造式において、アステリスクはZiに隣接するC(=O)と結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、[16]に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[18] Lが、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2OC(=O)-$ * で示され、

式中、アステリスクは、Dと結合していることを示し、

Bは、1,4-フェニル基を示し、

Lpは、 $-GGVA-$ 、又は、 $-VA$ を示し、

Laは、 $-(CH_2)_{n^9}-C(=O)-$ 、又は、 $-(CH_2CH_2)_{n^{10}}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_{n^{11}}-C^A-C(=O)-$ を示し、

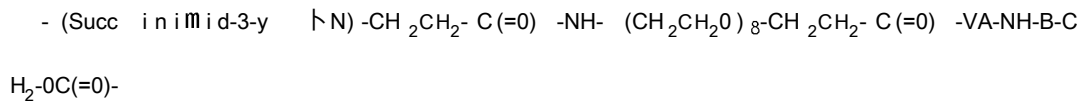
n^9 は2〜7の整数、 n^{10} は1〜3の整数、 n^{11} は6〜10の整数を示し、

Lbは、 $-(Succinimid-3-yl-N)-$ である、[1]〜[6]のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[19] Lが、以下の群：

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)_5-C(=O)-VA-NH-B-CH_2OC(=O)-$ 、

$-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)_5-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2OC(=O)-$ 、及び、



から選択されるいずれか一つであることを示し、

ここで、Bは1,4-フェニル基である、[18]に記載の抗体-薬物コンジュゲ-ト。

[20] 抗体が、IgGである、[1] ～ [19] のいずれか一つに記載の抗体-抗原複合物コンジュゲート。

[21] 抗体が、IgG1、IgG2 又は IgG4 である、 [20] に記載の抗体—薬物コン
ジュゲート。

[22] 抗体が、腫瘍細胞に結合し、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化することと特徴とする、[1] ～ [21] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

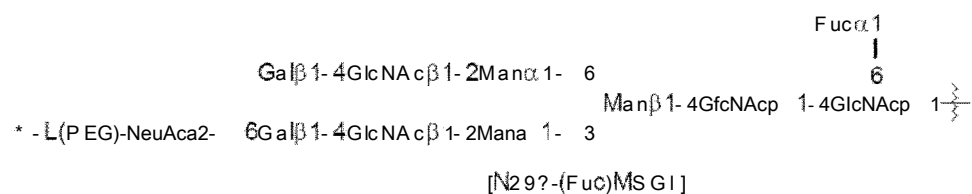
[23] 抗体が、更に抗腫瘍効果を有することを特徴とする、 [22] に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[24] 抗体が、抗体の Asn297 に結合する糖鎖（N297糖鎖）からLに結合している、[1] ～ [17]、[20] ～ [23] のいずれか一つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[25] N297 糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、[24] に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

[26] N297 糖鎖が、次式で示される構造を有する N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2 もしくはそれらの混合物、又は N297-(Fuc)SG である、 [24] 又は [25] に記載の抗体 薬物 コンジュゲート :

[化 16]



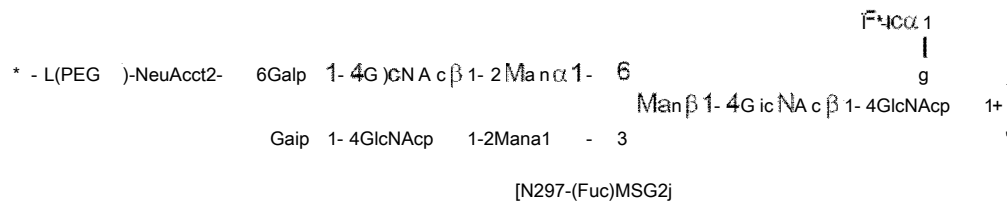
式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$ を示し、ここで、右端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLと結合していることを示し、及び

n^5 は 2 ～ 10 の整数を示す ;

[化 17]



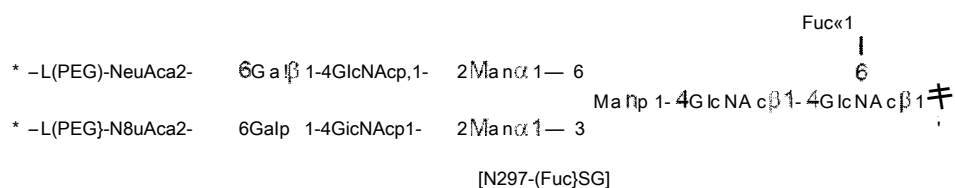
式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$ を示し、ここで、右端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-6 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLと結合していることを示し、及び

n^5 は 2 ～ 10 の整数を示す ; 並びに、

[化 18]



式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$ を示し、ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Man の分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、

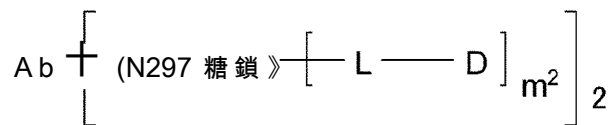
アステリスクは、前記 リンカーLと結合していることを示し、及び

n^5 は2～10の整数を示す。

[27] n^5 が2～5の整数である、 [26] に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[28] 次式：

[化 19]



(式中、 m^2 は1又は2を示し、

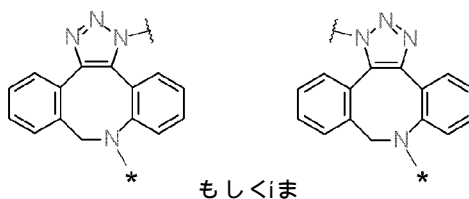
Lは、AbのN297糖鎖とDを連結するリンカーであって、以下の群：

$$-Z_1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - GGVA - NH - B - CH_2 - OC(=O) - ,$$
$$-\text{Zi}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$$
$$-Z'-C(=O) - (CH_2CH_2)_2 - C(=O) - VA-NH-B-CH_2-OC(=O) - ,$$
$$-V-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}C-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}C-\text{GGVC it-NH-B-CH}_2-\text{OC}(\text{O})-$$
$$-V-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}(\text{=O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}(\text{=O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}(\text{=O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{=O})-$$
$$-V-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$$
、及び
$$-V-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-(=O)-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-(=O)-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-(=O)-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}-(=O)-$$

から選択されるいずれか一つのリンカーであり、

ここで、Bは1,4-フェニル基であり、Z¹は以下の構造式：

[化 20]



を示し、

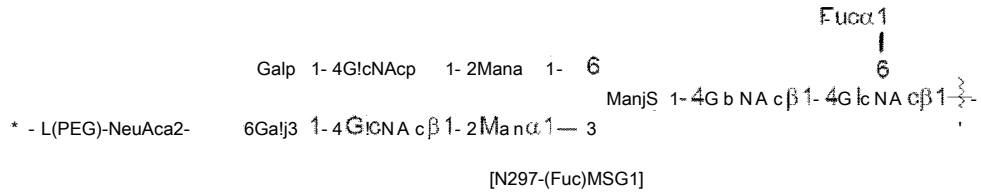
ここで、上記で示されるZ¹の構造式において、アステリスクはZ¹に隣接するC(=O)と結合していることを示し、波線はAbのN297糖鎖と結合していることを示し、

Abは、IgG抗体又は該抗体の機能性断片を示し、

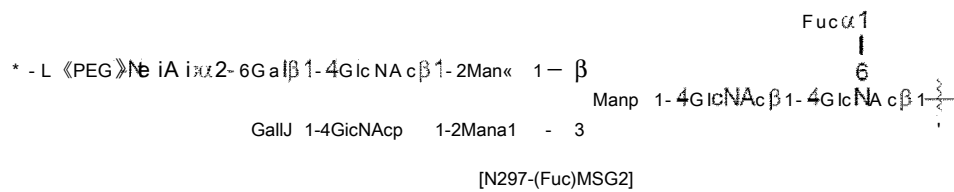
AbのN297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであること

を示し、

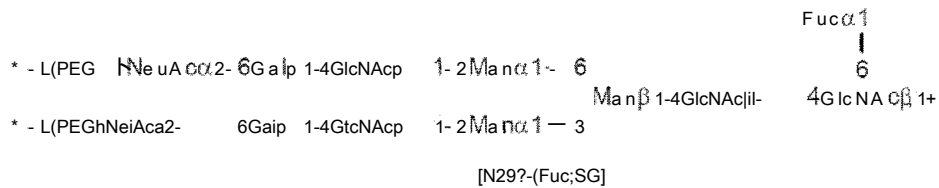
[化 21]



[化 22]



[化 23]



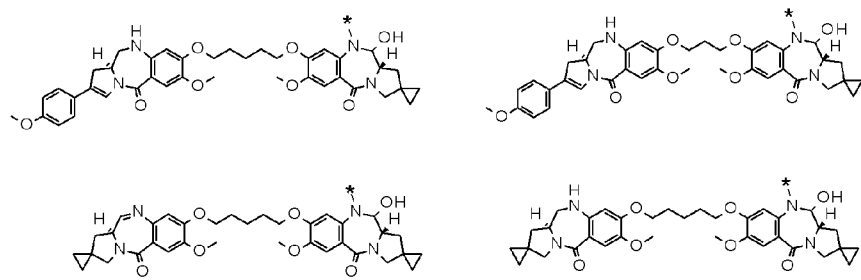
上記式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

N297 糖鎖中の L(PEG) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ を示し、

ここで、 n は 2～5 の整数であることを示し、左端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側又は / 及び 1-6 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、アステリスクは、前記リンカー L における Zi の トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、

D は、以下の群から選択されるいずれか一つであり、

[化24]



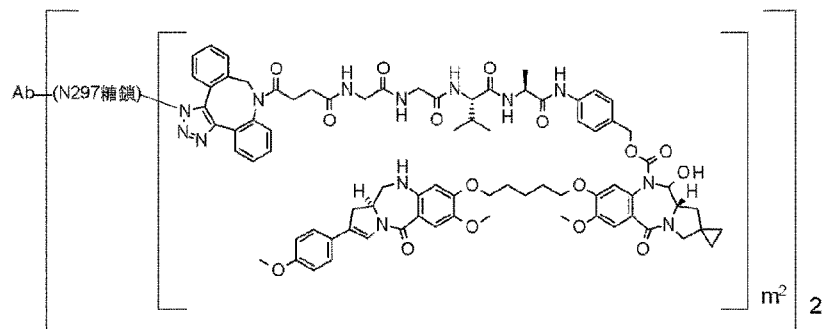
ここで、式中、アステリスクはLと結合していることを示す)

で示される [25] ～ [28] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲ

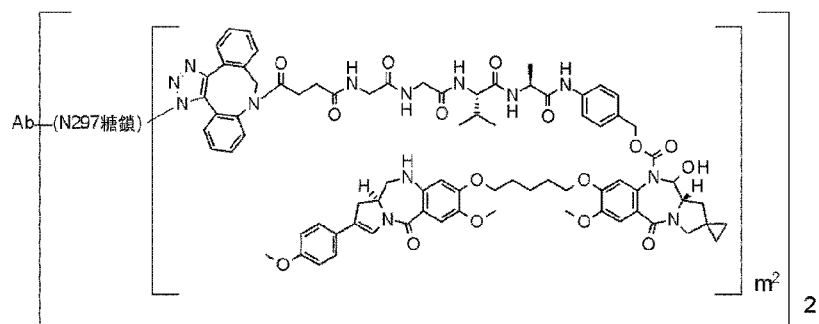
h o

[30] 次の群：

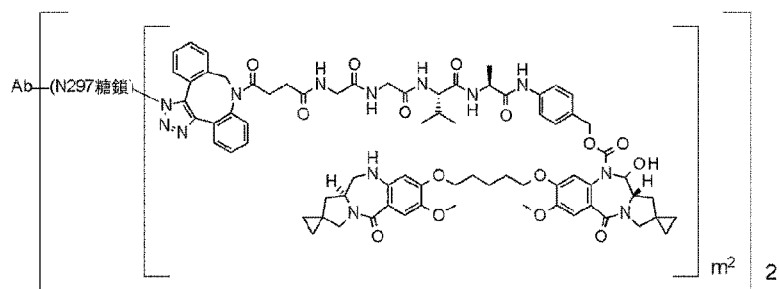
[化25]



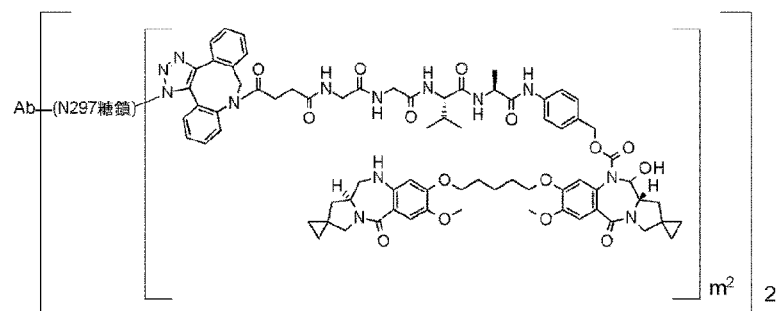
もしくは



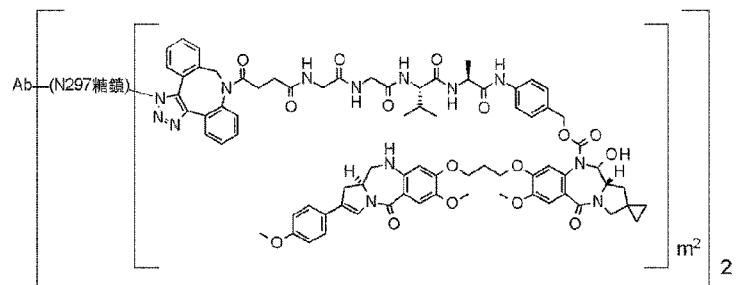
[化 26]



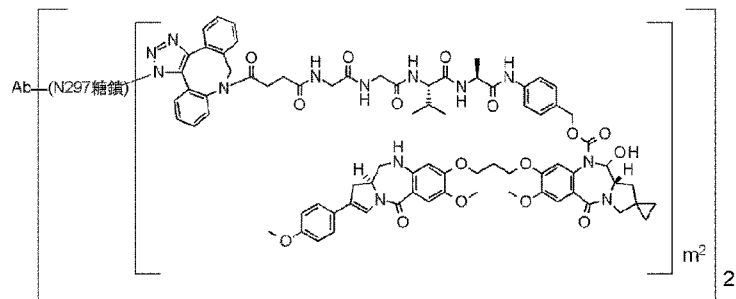
もしくは



[化 27]

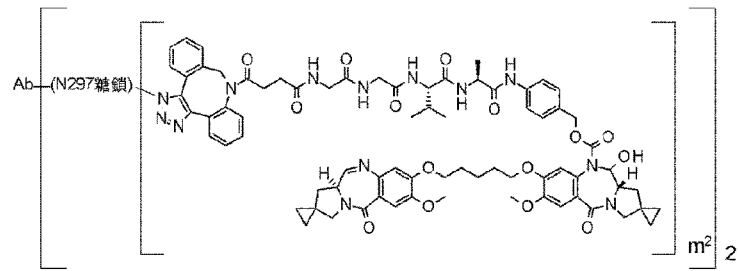


もしくは

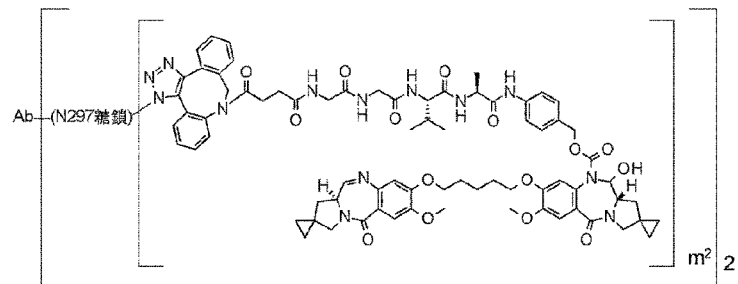


又は

[化28]



あしくま



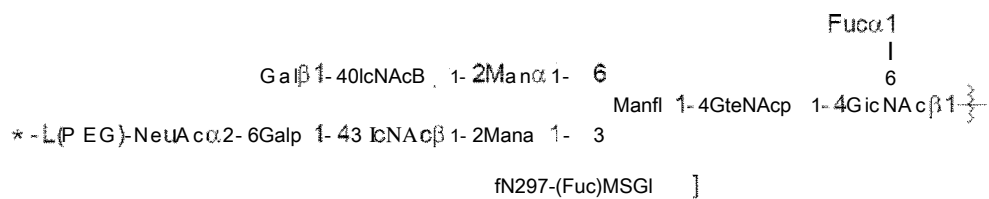
から選ばれ、

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

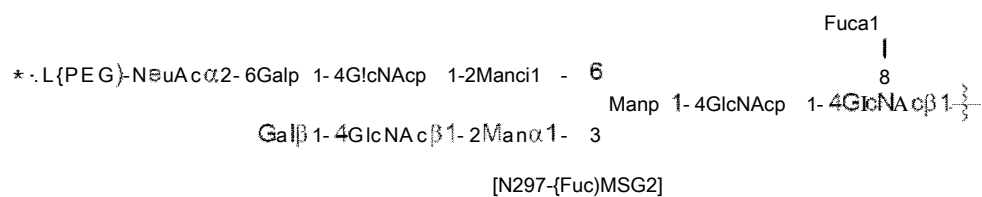
AbはIgG抗体又はその機能性断片であることを示し、

AbのN297糖鎖は次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであることを示し、

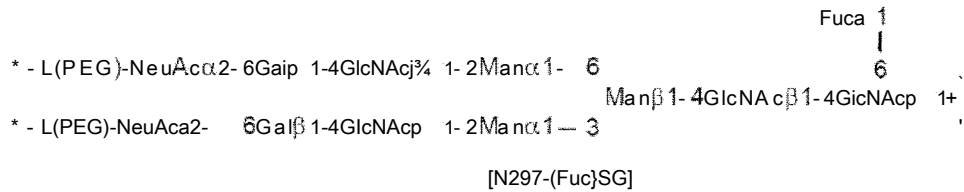
[化29]



[化30]



[化31]



式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

N297糖鎖中のL(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ であることを示し、

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

[30] CLDN6及び/又はCLDN9に結合する抗体又は該抗体の機能性断片。

[31] CLDN6が配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる分子であり、CLDN9が配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる分子である、[30]に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[32] 以下の(a)又は(b)に記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む重鎖、並びにCDRL1、CDRL2及びCDRL3を含む軽鎖を含んでなる、[30]又は[31]に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、並びに、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1又は2個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるCDRL3、

(b) 配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号16に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、並びに、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13

に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3。

[33] 以下の (a) 又は (b) に記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む重鎖、並びにCDRL1、CDRL2及びCDRL3を含む軽鎖を含んでなる、[32] に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列又は配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、

(b) 配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号16に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3。

[34] 以下の (a) 又は (b) に記載の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、[30] ～ [33] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号21に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号19に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(b) 配列番号25に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号23に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[35] 以下の (a) ～ (e) からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び (f) ～ (k) からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、[30] ～ [34] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号54に記載のアミノ酸配列、

(b) 配列番号58に記載のアミノ酸配列、

(c) 配列番号62に記載のアミノ酸配列、

(d) (a) ～ (c) の配列において各 CDR 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列、

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

(f) 配列番号 38 に記載のアミノ酸配列、

(g) 配列番号 42 に記載のアミノ酸配列、

(h) 配列番号 46 に記載のアミノ酸配列、

(i) 配列番号 50 に記載のアミノ酸配列、

(j) (f) ～ (i) の配列において各 CDR 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び

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

[36] 以下の (a) ～ (e) からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、 [35] に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号 54 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 38 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 58 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 42 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 54 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 46 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(d) 配列番号 58 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 50 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる軽鎖可変領域、及び、

(e) 配列番号 62 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 46 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[37] 抗体がキメラ抗体である、 [30] ～ [36] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[38] 抗体がヒト化抗体である、 [30] ～ [36] のいずれか一つに記載の抗

体又は該抗体の機能性断片。

[39] 抗体が、ヒトIgG1、ヒトIgG2又はヒトIgG4の重鎖定常領域を含む、[30]～[38]のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[40] 以下の(a)～(e)からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を含む、

[38] 又は [39] に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号52のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号36のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖(H1L1)、

(b) 配列番号56のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる、重鎖および配列番号40のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖(H2L2)、

(c) 配列番号52のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号44のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖(H1L3)、

(d) 配列番号56のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号48のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖(H2L4)、及び、

(e) 配列番号60のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号44のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖(H3L3)。

[41] [32]～[36]及び[40]のいずれか一つに記載の抗体が認識する抗原上の部位に結合する、[30]又は[31]に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[42] [32]～[36]及び[40]のいずれか一つに記載の抗体と、CLDN6及び/又はCLDN9への結合において競合する、[30]又は[31]に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[43] [30]～[42]のいずれか1項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[44] 以下の (a) ～ (j) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、[43] に記載のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号54に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号38に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号58に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号54に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号58に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号50に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号62に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号52のアミノ酸番号20～471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号36のアミノ酸番号21～234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号56のアミノ酸番号20～471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号40のアミノ酸番号21～234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、

(h) 配列番号52のアミノ酸番号20～471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号44のアミノ酸番号21～234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、

(i) 配列番号56のアミノ酸番号20～471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号48のアミノ酸番号21～234 に記

載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、及び、

(j) 配列番号60のアミノ酸番号20〜471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号44のアミノ酸番号21〜234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド。

[45] [43] 又は [44] のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

[46] [45] に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[47] 宿主細胞が真核細胞である [46] に記載の宿主細胞。

[48] 宿主細胞が動物細胞である [47] に記載の宿主細胞。

[49] [46] 〜 [48] のいずれか一つに記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含むことを特徴とする、[30] 〜 [42] に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の製造方法。

[50] [49] に記載の製造方法により得られることを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

[51] N-結合型糖鎖付加、O-結合型糖鎖付加、N末のプロセッシング、C末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末におけるメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、及び重鎖のカルボキシル末端における1つ又は2つのアミノ酸残基の欠失からなる群より選択される1又は2以上の修飾を含む、[30] 〜 [42] 及び [50] のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[52] 重鎖のカルボキシル末端において1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失している、[51] に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[53] 2本の重鎖の双方でカルボキシル末端において1つのアミノ酸残基が欠失している、[52] に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[54] 重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている、

[50] 〜 [53] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[55] 以下の工程：

i) [46] ～ [48] のいずれか一つに記載の宿主細胞を培養し、得られた培養物から目的の抗体を採取する工程、

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

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

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

[56] 更に、工程 に、 の反応液を、ハイドロキシアパタイトカラムによる精製により (Fuc α 1, 6)G LcNAc — 抗体を精製する工程を含む、 [55] に記載の製造方法。

[57] 以下の工程：

i) [55] 又は [56] に記載の方法により、糖鎖リモデリング抗体を製造する工程、及び

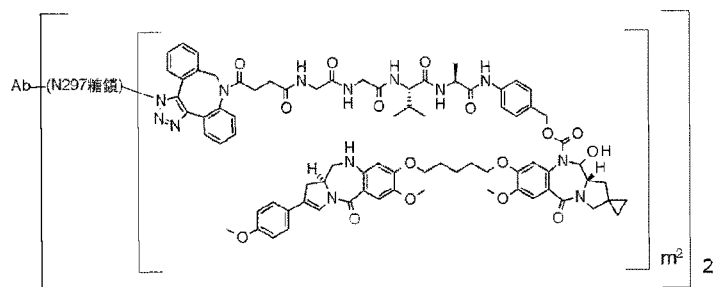
ii) DBCO を有するドラッグリンカー (製造中間体) を工程 i) で作製された糖鎖リモデリング抗体の糖鎖におけるアジド基と反応させる工程を含む、 [1] ～ [29] のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート体の製造方法。

[58] [55] 又は [56] に記載の製造方法で得られることを特徴とする、糖鎖リモデリング抗体。

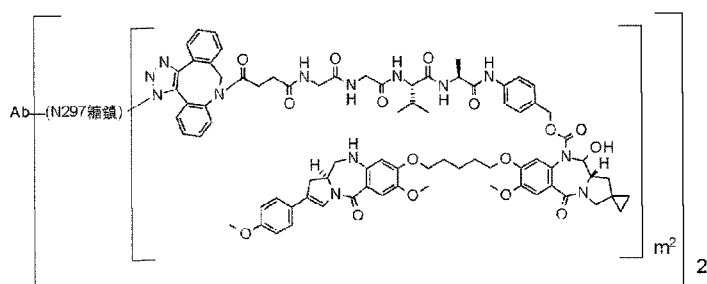
[59] [57] に記載の製造方法で得られることを特徴とする、抗体-薬物コンジュゲート。

[60] 次の群：

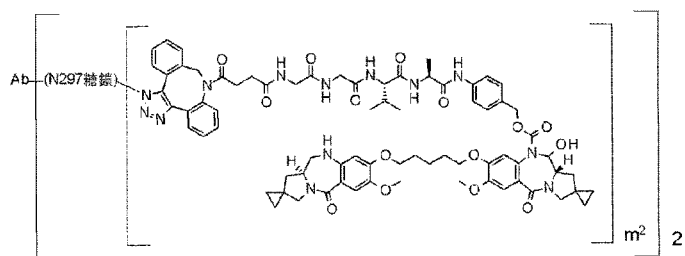
[化 32]



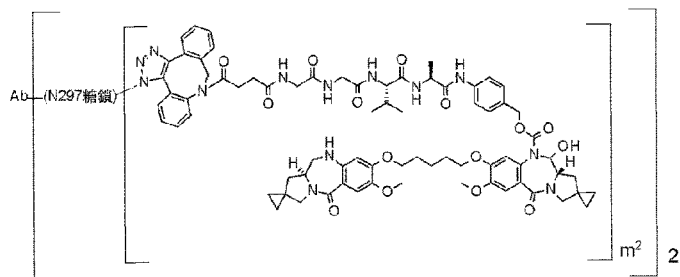
もしくは



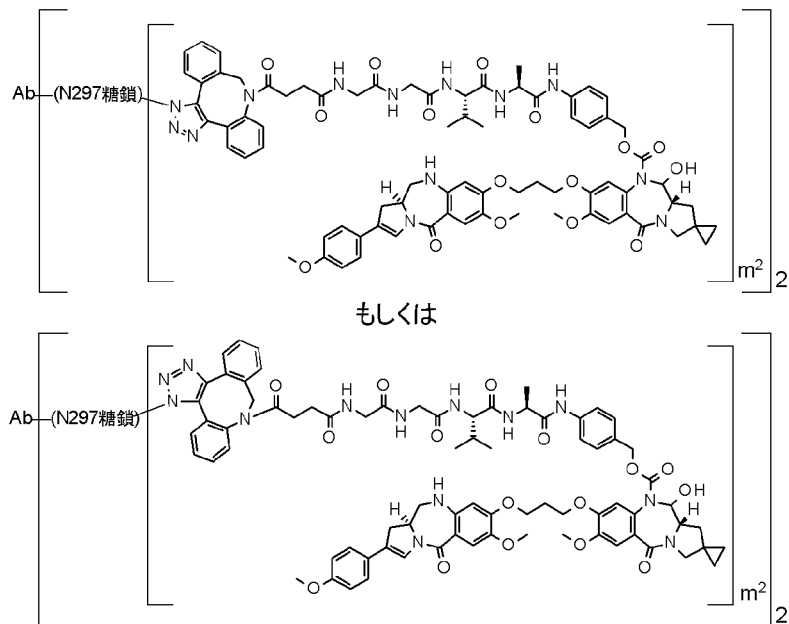
[化 33]



もしくは

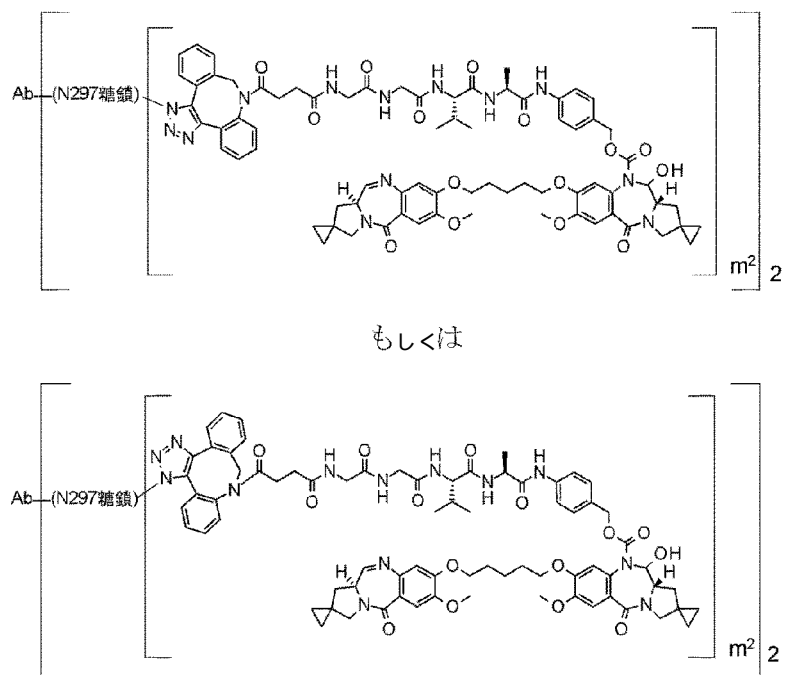


[化 34]



、又は、

[化 35]



から選ばれ、

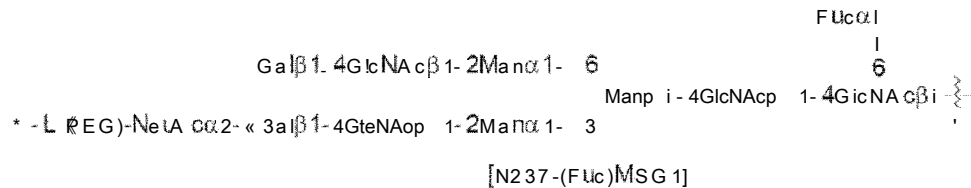
上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2であることを示し、

Abは、[30] ～ [42]、[50] ～ [54] 及び [58] のいずれか一つに記載の抗体もし

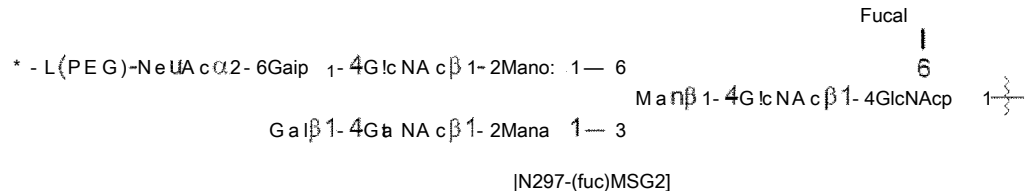
くは該抗体の機能性断片又は抗 HER2 抗体であることを示し、

Ab の N297 糖鎖は、次式で示される構造を有する N297- (Fuc) MSG1、N297- (Fuc) MSG2 もしくはそれらの混合物、又は N297- (Fuc) SG のいずれか一つであることを示し、

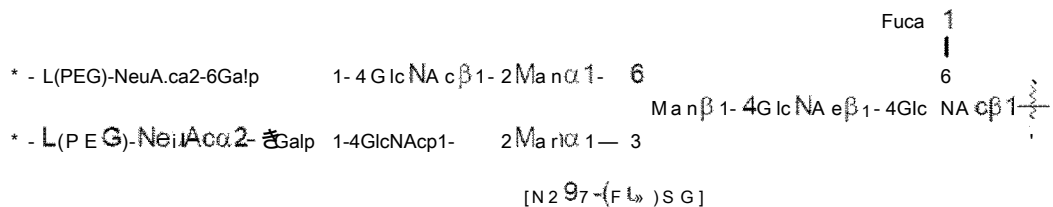
[化 36]



[化 37]



[化 38]



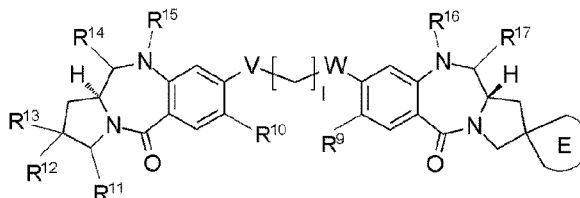
式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{CH}_2\text{)}_3\text{-}^*$ であることを示し、ここで、左端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側又は / 及び 1-6 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、アステリスクは、それぞれの構造式における トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示す、抗体—薬物コンジュゲート。

[61] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1-3又は3-5である、[1] - [29]、[59] - [60]のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[62] 次式

[化 39]



(式中、 l は、2から8の整数を示し、

E は、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環、又は3～5員の飽和複素環を示し、

R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、 c_1 ～ C_6 アルコキシ基、 c_1 ～ C_6 アルキル基、水素原子、水酸基、チオール基、 c_1 ～ C_6 アルキルチオ基、ハロゲン原子又は $-NR'$ R' を示し、

ここで、 R' 及び R' は、それぞれ独立して、水素原子又は c_1 ～ C_6 アルキル基を示し、

R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} は、下記 (i) ～ (iii) から選択され、

(i) R^{11} 及び R^{12} が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに、二重結合を形成し、

R^{13} は、群7から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群8から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい c_1 ～ C_6 アルキル基を示す、

(ii) R^{11} は、水素原子を示し、

R^{12} 及び R^{13} が一緒になって、3～5員の飽和炭化水素環もしくは3～5員の飽和複素環又は $CH_2=$ を形成する、又は、

(iii) R^{11} 及び R^{12} が一緒になって、群9から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環を形成し、

R^{13} は、単結合を示す、

R^{14} 及び R^{15} は、共に水素原子を示すか、 R^{14} 及び R^{15} が一緒になって、イミン結合 ($C=N$) であることを示し、

R^{16} 及び R^{17} は、下記 (a) 又は (b) を示し、

(a) R^{16} 及び R^{17} が一緒になって、イミン結合 ($N=C$) を形成する、

(b) R^{16} は、 $J-La'-Lp'-NH-B'-CH_2-O(C=O)-*$

式中、アステリスクは、 R^{16} に隣接する窒素原子に結合していることを示し、

、

B' はフェニル基又はヘテロアリール基を示し、

Lp' は、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示し、

La' は、以下の群：

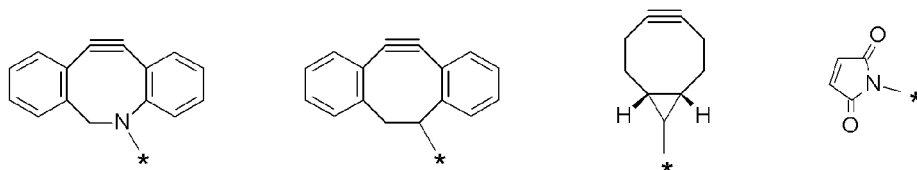
- $C(=O)-(CH_2CH_2)^{n^6}-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)^{n^6}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)^{n^7}-C(=O)-$ 、
- $C(=O)-(CH_2CH_2)^{n^6}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)^{n^7}-CH_2-C(=O)-$ 、
- $C(=O)-(CH_2CH_2)^{n^6}-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)^{n^7}-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-(CH_2)^{n^8}-O-C(=O)-$ 、
- $(CH_2)^{n^{12}}-C(=O)-$ 、及び、 $-(CH_2CH_2)^{n^{13}}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)^{n^{14}}-CH_2CH_2-C(=O)-$

から選択されるいずれか一つを示し、

ここで、式中、 n^6 は 1～3 の整数、 n^7 は 1～5 の整数、 n^8 は 0～2 の整数、 n^{12} は 2～7 の整数、 n^{13} は 1～3 の整数、 n^{14} は 6～10 の整数を示し、

J は、以下で示されるいずれか一つを示し、

[化40]



ここで、上記で示される J の構造式において、アステリスクは La' と結合していることを示し、

R^{17} は、水酸基又は $C1\sim C3$ アルコキシ基であることを示し、

v 及び w は、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子、又は硫黄原子であり、

、

群 7 は、a) 1～3 個のハロゲン原子で置換されていてもよい $C1\sim C6$ アルコキシ基、

- b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-\text{OCOR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}')-\text{NR}'$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}')-\text{NR}'\text{R}''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基、
- c) ハロゲン原子、
- d) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、
- e) C_1 〜 C_6 アルキルチオ基、
- f) $-\text{NR}'\text{R}'$ 、
- g) $-\text{C}(=\text{NR}')-\text{NR}''\text{R}'''$ 、
- h) $-\text{NHC}(=\text{NR}')-\text{NR}''\text{R}'''$ 、
- i) $-\text{NHCOR}'$ 、又は
- j) 水酸基を示し、

ここで、 R' 及び R'' は、前で定義した通りであり、 R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_6 アルキル基を示し、

群8は、ハロゲン原子、水酸基、又は C_1 〜 C_6 アルコキシ基を示し、並びに、

群9は、ハロゲン原子、又は1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基もしくは C_1 〜 C_6 アルコキシ基を示す)

で示される化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[63] Eが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^9 及び R^{10} が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^{11} 及び R^{12} が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、

R^{13} が、群10から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群11から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基であることを示し、

V及びWが、酸素原子であり、

群10は、a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルコキシ基、

- b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')-NR''R'''$ 、及び $-NHC(=NR')-NR''R'''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基、
- c) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、
- d) $-C(=NR')-NR''R'''$ 、
- e) $-NHC(=NR')-NR''R'''$ 、又は
- f) 水酸基を示し、

ここで、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基を示し、並びに、

群11は、ハロゲン原子、水酸基、又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示す、[62]に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[64] Eが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^9 及び R^{10} が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^{11} が、水素原子を示し、

R^{12} 及び R^{13} が、 R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒にあって、3〜5員の飽和炭化水素環又は $CH_2=$ を形成し、並びに、

V及びWが、酸素原子である、[62]に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[65] Eが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^9 及び R^{10} が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} が、 R^{11} が結合している炭素原子並びに R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒にあって、群12から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環を形成し、

V及びWが、酸素原子であり、並びに、

群12は、ハロゲン原子、又は1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基もしくは C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示す、[62]に記載の化

合物、その塩、又は、それらの水和物。

[66] B' が、1,4_フエニル基、2,5_ピリジル基、3,6_ピリジル基、2,5_ピリミジル基、2,5_チエニル基から選択されるいずれか一つである、

[62] ~ [65] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[67] B' が、1,4_フエニル基である、[66] に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[68] Lp' が、以下の群：

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D-)P

-1-、及び-GGPL-から選択されるアミノ酸残基である、[62] ~ [67] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[69] La' が、以下の群：

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、-OC(=O)-、

-(CH₂)₅-C(=O)-、及び、-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₈-CH₂CH₂-C(=O)-

から選択される、[62] ~ [68] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[70] Ri6 が、J—La'—Lp'—NH—B'—CH₂—O—C(=O)—*

で示され、

式中、B' は、1,4_フエニル基であり、

Lp' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、及び、-G

GPL-

La' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

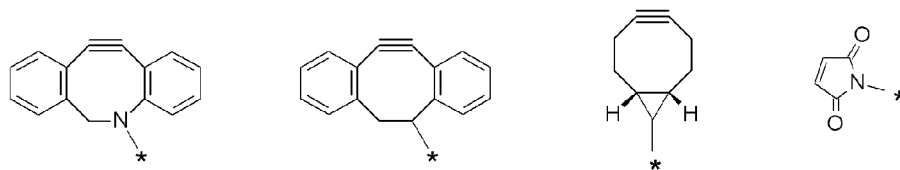
-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂O) ₂-CH₂- C(=O) - 、
 - C(=O) -CH₂CH₂-NH-C (=0) - (CH₂CH₂O) ₄-CH₂CH₂- C(=O) - 、 -CH₂-OC (=0) - 、 -OC (=0) - 、
 -(CH₂) ₅-C(=O)- 、 及び 、 -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂O) ₈-CH₂CH₂- C(=O) -
 、 並び に、

Jは、以下で示されるいずれか一つを示し、

[化 4 1]



ここで、Jの構造式において、アステ リスクはLa' と結合 していることを示す、 [62] ～ [69] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[71] Ri6 が、以下の群：

J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GG- (D-) VA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) - (CH₂CH₂) ₂- C(=O) -VA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPI-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGFG-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVC i t-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVK-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPL-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂) ₂- C(=O) -VA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂O) ₂-CH₂- C(=O) -VA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J¹- C(=O) -CH₂CH₂-NH-C (=0) - (CH₂CH₂O) ₄-CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J₂-OC (=0) -GGVA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、
 J³-CH₂-OC (=0) -GGVA-NH-B' -CH₂-OC (=0) - 、

J^4 - $(CH_2)_5$ -C(=O)-GGVA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

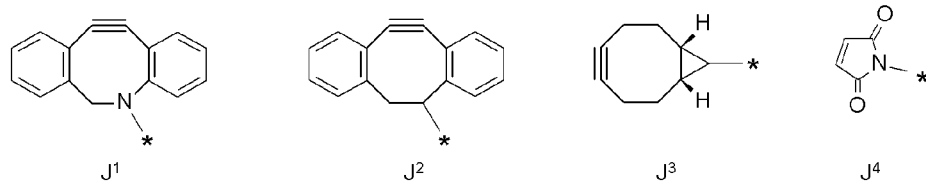
J^4 - $(CH_2)_5$ -C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、及び

J^4 -CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₈-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-

から選択され、

ここで、 J^1 、 J^2 、 J^3 及び J^4 は、以下の構造式：

[化42]



を示し、

ここで、 J 、 J^2 、 J^3 及び J^4 の構造式において、アステリスクは隣接する基と結合していることを示し、並びに、

B' は、1,4-フェニル基である、[62] ～ [70] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[72] Ri6 が、以下の群：

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVCit-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-N

H-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、

J^4 - $(CH_2)_5$ -C(=O)-GGVA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-、及び、

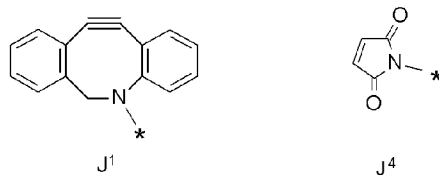
J^4 - $(CH_2)_5$ -C(=O)-VA-NH-B' -CH₂-OC(=O)-

から選択され、

ここで、B' は1,4-フェニル基であり、

J 、 J^4 は、以下の構造式：

[化43]

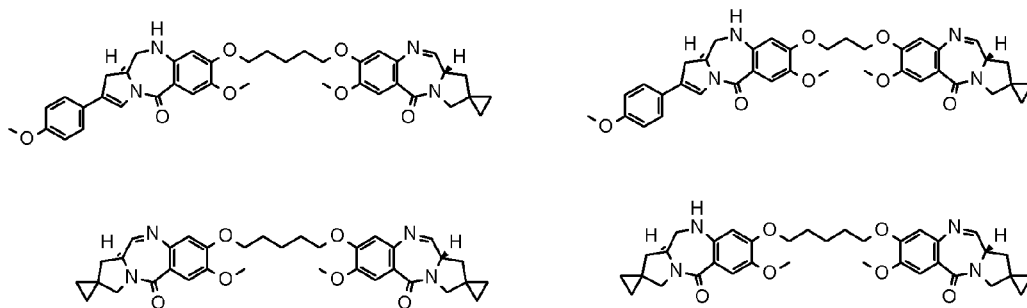


を示し、

ここで、J¹及びJ⁴の構造式において、アステリスクは隣接する基と結合していることを示す、[62] ～ [71] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[73] 次式：

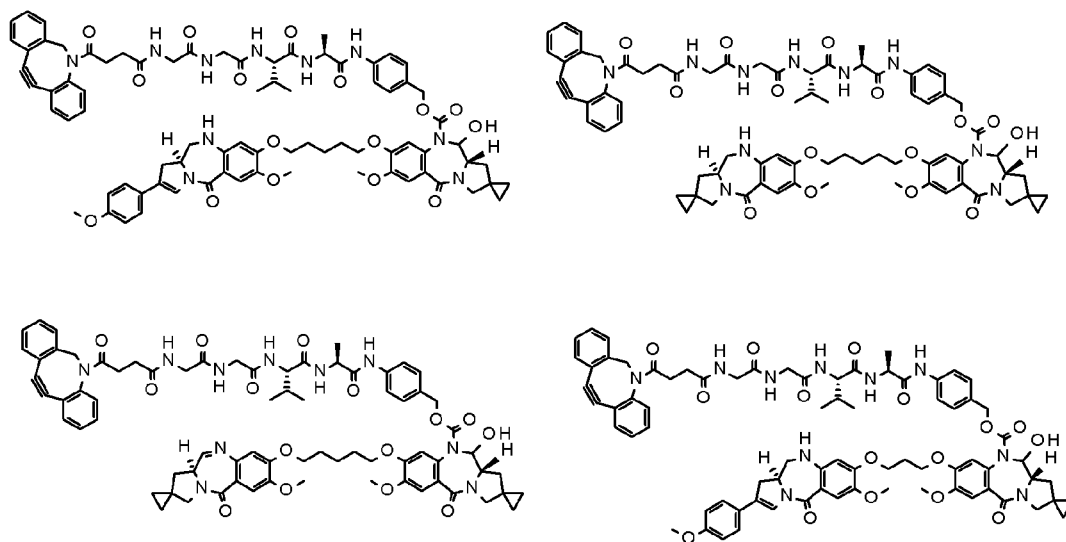
[化44]



で示されるいずれか一つの化合物、その塩、又はそれらの水和物。

[74] 次式：

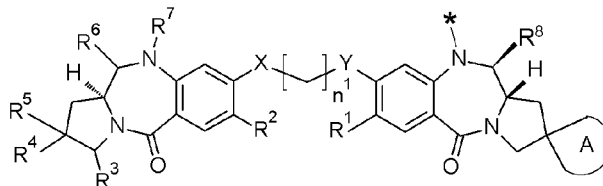
[化 45]



で示されるいずれか一つの化合物、その塩、又はそれらの水和物。

[75] Dは、次式：

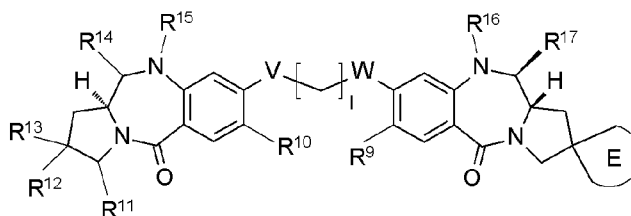
[化 46]



で示される [1] ～ [29] 及び [59] ～ [61] のいずれか一つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[76] 次式：

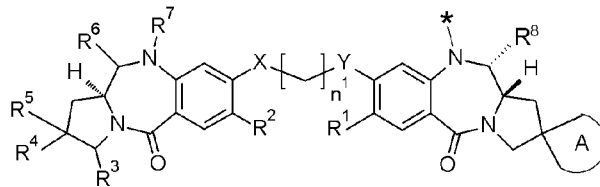
[化 47]



で示される [62] ～ [72] 及び [74] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又はそれらの水和物。

[77] Dは、次式：

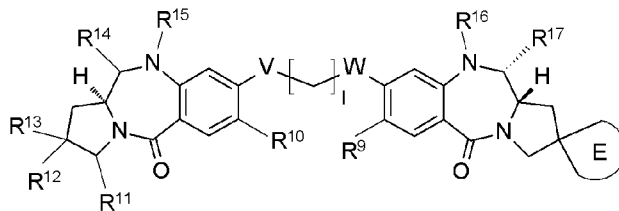
[化 48]



で示される [1] ～ [29] 及び [59] ～ [61] のいずれか一つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[78] 次式：

[化 49]



で示される [62] ～ [72] 及び [74] のいずれか一つに記載の一つの化合物、その塩、又はそれらの水和物。

[79] [1] ～ [29] 、 [59] ～ [61] 、 [75] 及び [77] のいずれか一つに記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物、 [30] ～ [42] 、 [50] ～ [54] 及び [58] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片、及び、 [62] ～ [74] 、 [76] 及び [78] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを含むことを特徴とする医薬組成物。

[80] 抗腫瘍薬であることを特徴とする、 [79] のいずれか一つに記載の医薬組成物。

[81] 腫瘍が CLDN6 及び / 又は CLDN9 が発現している腫瘍であることを特徴とする、 [80] に記載の医薬組成物。

[82] 腫瘍が卵巣癌（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、胃癌、子宮体癌、精巣癌（セミノーマ、非セミノーマ）、子宮頸癌、精巣癌、胎盤絨毛癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、

前立腺癌、多形神経膠芽腫、脳腫瘍、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌又は食道癌であることを特徴とする、[80]又は[81]に記載の医薬組成物。

[83] [1] ～ [29]、[59] ～ [61]、[75] 及び [77] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物、[30] ～ [42]、[50] ～ [54] 及び [58] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片、及び、[62] ～ [74]、[76] 及び [78] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[84] 腫瘍が CLDN6 及び / 又は CLDN9 が発現している腫瘍であることを特徴とする、[83] に記載の腫瘍の治療方法。

[85] 腫瘍が、卵巣癌（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、胃癌、子宮体癌、精巣癌（セミノーマ、非セミノーマ）、子宮頸癌、精巣癌、胎盤絨毛癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、脳腫瘍、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌又は食道癌であることを特徴とする、[83] 又は [84] に記載の治療方法。

[86] [1] ～ [29]、[59] ～ [61]、[75] 及び [77] のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物、[30] ～ [42]、[50] ～ [54] 及び [58] のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片、及び、[62] ～ [74]、[76] 及び [78] のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又はそれらの水和物から選択される少なくとも一つを含む医薬組成物、及び少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[87] Table 1 又は Table 2 に記載されるものに実質的に類似するピーク位置を有するプロトン NMR を示す化合物。

発明の効果

[0008] 本発明の提供する新規な抗体—ピロロベンゾジアゼピン（PBD）誘導体コン

ジュゲートは優れた抗腫瘍活性と安全性を有するため、抗腫瘍剤として有用である。また、本発明のPBD誘導体は抗腫瘍活性を有し、該コンジュゲートの薬物として有用である。更に、本発明の抗体は腫瘍細胞を認識又は腫瘍細胞に結合するため、該コンジュゲートの抗体として有用である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] 本発明の薬物—コンジュゲート体 (I) の分子) を模式的に表したものである。(a) は薬物D、(b) はリンカー、(c) は N_3 -L(PEG)-、(d) はN297糖鎖 (ここで、白の楕円はNeuAc(Sia)、白の六角形はMan、塗りつぶした六角形はGlcNAc、白のひし形はGal及び、白の逆三角形はFuc)、をそれぞれ表す。(b) と (c) は (c) のアジド基 (黒の涙型) と (b) のスペーサー (白の半円) におけるアルキン構造が反応し、トリアゾール環を形成して結合している。Y字型は、抗体Abを表す。また、本模式図では、N297糖鎖を便宜上N297-(Fuc)MSGとして表示し、N297糖鎖それぞれの一方の分岐鎖においてのみアジド基を有するPEGリンカー (N_3 -L(PEG)-) が結合したシアル酸を有し、他方の分岐鎖の非還元末端にシアル酸を持たない態様を示しているが、N297-(Fuc)SGを採用することで、両方の分岐鎖の非還元末端にアジド基を有するPEGリンカーが結合したシアル酸を有する態様でもよい。このような表示方法は、特に言及がない限り、本明細書の全体を通じて適用される。

[図2] 本発明の薬物—コンジュゲート体の製造中間体である、(Fuc α 1,6)GlcNAc-抗体 (図2のAの (II) の分子)、及び、MSG型糖鎖リモデリング抗体 (図2のBの (III) の分子) の構造を示す模式図である。両方の図において、Y字型は図1と同様に抗体Abを表す。図2のAにおいて、(e) はFucの1位と、6位において α グリコシド結合したGlcNAcのみからなるN297糖鎖を示す。図2のBにおいて、(d) は図1と同様のN297糖鎖を表し、(f) は、アジド基を有するPEGリンカー部分の構造であり、末端にリンカーLとの結合に供されるアジド基を表す。アジド基を有するPEGリンカーの結合様式は、図1の説明と同様である。

[図3] 動物細胞で産生された抗体からMSG型糖鎖リモデリング抗体を製造する

工程の模式図である。図中の分子 (II)、(III) は、図2と同様に、(Fuc α 1, 6) GLcNAc —抗体及びMSG型糖鎖リモデリング抗体をそれぞれ表す。(IV)の分子は動物細胞で産生された抗体であり、N297糖鎖が不均一な分子の混合物である。図3Aは、(IV)の不均一なN297糖鎖を、EndoSのような加水分解酵素で処理することで、均一な(Fuc α 1, 6) GLcNAc —抗体 (II) が作製される工程を示す。図3Bは、抗体 (II) のN297糖鎖のGlcNAcに対して、EndoS D233 Q/Q303L 変異体のような糖転移酵素を用いて、MSG型糖鎖ドナー分子の糖鎖を糖鎖転移させることで、(II I)のMSG型糖鎖リモデリング抗体が作製される工程を示す。ここで用いられるMSG型糖鎖ドナー分子は、MSGの非還元末端のシアル酸がアジド基を有するPEGリンカーで修飾されたものであり、作製されるMSG型N297糖鎖リモデリング抗体においても、図2Bで説明したとおり、非還元末端のシアル酸が同様の修飾を受けたものとなる。図3Bにおいては、便宜上ドナー分子としてMSGを表示しているが、SG (10) を糖鎖ドナーとすることで、(III)のリモデリング抗体はN297糖鎖の両方の非還元末端にアジド基を有するリンカー分子が結合した糖鎖リモデリング抗体が合成される。

[図4]皮下移植したヒト胃癌株であるNCI — N87細胞への抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC26、ADC19、ADC54の効果を示す。

[図5]皮下移植したヒト胃癌株であるNCI — N87細胞への抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49、Trastuzumab, 抗LPS抗体 - 薬物コンジュゲートADC53の効果を示す

[図6]皮下移植したヒト乳癌株であるKPL — 4細胞への抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49、抗LPS抗体 - 薬物コンジュゲートADC53又はTrastuzumab-Tesirine (参考例1)の効果を示す。

[図7]皮下移植したヒト乳癌株であるJIMT-1細胞への抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49、又はTrastuzumab-Tesirine (参考例1)の効果を示す。

[図8]皮下移植したヒト卵巣癌株であるOV-90細胞への抗CLDN6抗体 - 薬物コンジュゲートADC40、又は抗CLDN6抗体 (H1L1)-Tesirine (参考例1)の効果を示す。

[図9]皮下移植したヒト卵巣癌株であるNIH :OVCA3細胞への抗CLDN6抗体 - 薬物コンジュゲートADC40、又は抗CLDN6抗体 (H1L1)-Tesi rine (参考例1) の効果を示す。

[図10]皮下移植したヒト頭頸部癌細胞株であるFaDu細胞への抗体 - 薬物コンジュゲート抗TR0P2抗体 - 薬物コンジュゲートADC50、又は抗LPS抗体 - 薬物コンジュゲートADC53の効果を示す。

[図11]ヒトCLDN6の全長アミノ酸配列 (配列番号1) 及び全長cDNAの塩基配列 (配列番号2) を示す。

[図12]ヒトCLDN9の全長アミノ酸配列 (配列番号3) 及び全長cDNAの塩基配列 (配列番号4) を示す。

[図13]B1抗体軽鎖のCDRL1〜3のアミノ酸配列 (配列番号5〜7) を示す。

[図14]ヒト化B1抗体軽鎖L4のCDRL3のアミノ酸配列 (配列番号8) を示す。

[図15]B1抗体重鎖のCDRH1〜3のアミノ酸配列 (配列番号9〜11) を示す。

[図16]C7抗体軽鎖のCDRL1〜3のアミノ酸配列 (配列番号12〜14) を示す。

[図17]C7抗体重鎖のCDRH1〜3のアミノ酸配列 (配列番号15〜17) を示す。

[図18]B1抗体軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列 (配列番号18) 及びB1抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号19) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図19]B1抗体重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列 (配列番号20) 及びB1抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号21) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図20]C7抗体軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列 (配列番号22) 及びC7抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号23) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図21]C7抗体重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列 (配列番号24) 及びC7抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号25) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図22]chB1軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号28) 及びchB1軽鎖のアミノ酸配列

をコードするDNA配列を含むDNA断片（配列番号29）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図23]chB1 軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号30）及びchB1 軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号31）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図24]chB1 重鎖のアミノ酸配列（配列番号32）及びchB1 重鎖をコードするヌクレオチド配列（配列番号33）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図25]chB1 重鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号34）及びchB1 重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号35）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図26] ヒト化抗体軽鎖hL1のアミノ酸配列（配列番号36）及びヒト化抗体軽鎖hL1をコードするヌクレオチド配列（配列番号37）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図27] ヒト化抗体軽鎖hL1の可変領域のアミノ酸配列（配列番号38）及びヒト化抗体軽鎖hL1の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号39）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図28] ヒト化抗体軽鎖hL2のアミノ酸配列（配列番号40）及びヒト化抗体軽鎖hL2をコードするヌクレオチド配列（配列番号41）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図29] ヒト化抗体軽鎖hL2の可変領域のアミノ酸配列（配列番号42）及びヒト化抗体軽鎖hL2の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号43）を示す。

[図30] ヒト化抗体軽鎖hL3のアミノ酸配列（配列番号44）及びヒト化抗体軽鎖hL3をコードするヌクレオチド配列（配列番号45）を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図31] ヒト化抗体軽鎖hL3の可変領域のアミノ酸配列（配列番号46）及びヒト化抗体軽鎖hL3の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号47）を示す。

す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図32] ヒト化抗体軽鎖 hL4 のアミノ酸配列 (配列番号48) 及びヒト化抗体軽鎖 hL4 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号49) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図33] ヒト化抗体軽鎖 hL4 の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号50) 及びヒト化抗体軽鎖 hL4 の可変領域をコードするヌクレオチド配列 (配列番号51) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図34] ヒト化抗体重鎖 hH1 のアミノ酸配列 (配列番号52) 及びヒト化抗体重鎖 hH1 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号53) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図35] ヒト化抗体重鎖 hH1 の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号54) 及びヒト化抗体重鎖 hH1 の可変領域をコードするヌクレオチド配列 (配列番号55) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図36] ヒト化抗体重鎖 hH2 のアミノ酸配列 (配列番号56) 及びヒト化抗体重鎖 hH2 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号57) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図37] ヒト化抗体重鎖 hH2 の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号58) 及びヒト化抗体重鎖 hH2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列 (配列番号59) を示す。

[図38] ヒト化抗体重鎖 hH3 のアミノ酸配列 (配列番号60) 及びヒト化抗体重鎖 hH3 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号61) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図39] ヒト化抗体重鎖 hH3 の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号62) 及びヒト化抗体重鎖 hH3 の可変領域をコードするヌクレオチド配列 (配列番号63) を示す。アミノ酸配列における下線はCDR配列を示す。

[図40] B1抗体及びC7抗体のフローサイトメトリーによるヒトCLDN6及びフアミリー分子CLDN3、CLDN4、CLDN9に対する結合能を示す。

[図41] B1抗体及びC7抗体のMab - ZAPによる抗体内在化活性能を示す。

[図42] ヒト化抗CLDN6抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、及びH3L3のフローサイトメトリーによるCLDN6及びフアミリー分子に対する結合能を示す。

[図43] Trastuzumab 軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号64) 及び重鎖のアミノ酸配列 (配列番号65) を示す。

[図44] Trastuzumab 変異体の軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号73) 及び重鎖のアミノ酸配列 (配列番号75) を示す。

[図45] ヒトキメラ化抗CLDN6抗体chB 1の重鎖であるchB 1—H、ヒト化抗体重鎖であるhH1、hH2及びhH3のアミノ酸配列の比較を示す図。「・」はchB 1—Hと同一のアミノ酸残基を示し、アミノ酸残基が記載されている箇所は置換されたアミノ酸残基を示す。

[図46] ヒトキメラ化抗CLDN6抗体chB 1の軽鎖であるchB 1—L、ヒト化抗体軽鎖であるhL1、hL2、hL3及びhL4のアミノ酸配列の比較を示す図。「・」はchB 1—Lと同一のアミノ酸残基を示し、アミノ酸残基が記載されている箇所は置換されたアミノ酸残基を示す。

[図47] 皮下移植したヒト乳癌株であるKPL—4細胞への抗HER2抗体—薬物コンジュゲートADC49及びADC55の効果を示す。

[図48] 皮下移植したヒト乳癌株であるJIMT—1細胞への抗HER2抗体—薬物コンジュゲートADC55の効果を示す。

[図49] 皮下移植したヒト膵臓癌株であるCFPAC—1細胞への抗HER2抗体—薬物コンジュゲートADC49及びADC55、抗LPS抗体—薬物コンジュゲートADC53の効果を示す。

発明を実施するための形態

[00 10] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートは、腫瘍細胞を認識又は結合できる抗体に、リンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させた抗腫瘍性薬物である。

[00 11] 本発明において、「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

[00 12] 本発明において、「C1—C6アルキル基」とは、炭素数1—6の直鎖、分岐鎖

のアルキル基を意味する。「 C_{1-6} アルキル基」としては、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、 n -ブチル基、 i -ブチル基、 s -ブチル基、 t -ブチル、 n -ペンチル基、 n -ヘキシル等が挙げられる。

[00 13] 本発明において、「 C_{1-6} アルコキシ基」とは、炭素数1-6の直鎖、分岐鎖のアルキル基を有するアルコキシ基を意味する。「 C_{1-6} アルコキシ基」としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、 i -プロポキシ基、 n -ブトキシ基、 i -ブトキシ、 s -ブトキシ基、 n -ペンチルオキシ基、 n -ヘキシルオキシ等が挙げられる。

[00 14] 本発明において、「 C_{1-6} アルキルチオ基」とは、炭素数1-6の直鎖、分岐鎖のアルキル基を有するアルキルチオ基を意味する。「 C_{1-6} アルキルチオ基」としては、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、 n -プロピルチオ基、 i -プロピルチオ基、 n -ブチルチオ基、 i -ブチルチオ基、 s -ブチルチオ基、 t -ブチルチオ基、 n -ペンチルチオ基、 n -ヘキシルチオ基等が挙げられる。

[00 15] 本発明において、「3-5員の飽和炭化水素環」とは、炭素数3-5の飽和環状炭化水素基を意味する。「3-5員の飽和炭化水素環」としては、例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基が挙げられる。

[00 16] 本発明において、「 C_3-C_5 シクロアルコキシ基」とは、炭素数3-5の飽和環状炭化水素基を有するシクロアルコキシ基を意味する。「 C_3-C_5 シクロアルコキシ基」としては、例えば、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基、シクロペンチルオキシ基が挙げられる。

[00 17] 本発明において、「3-5員の飽和複素環」とは、1, 3-プロピレンオキシド、アザシクロブタン、トリメチレンスルフィド、テトラヒドロフラン、ピロリジン等が挙げられる。

[00 18] 本発明において、「アリール基」とは、フェニル基、ベンジル基、インデニル基、ナフチル基、フルオレニル基、アントラニル基、フェナンスレニル基等が挙げられる。

[00 19] 本発明において、「ヘテロアリール基」とは、チエニル基、ピロリル基、

ピラゾリル基、 トリアゾリル基、 オキサゾリル基、 オキサジアゾリル基、 チアゾリル基、 ピリジル基、 ピリミジル基、 ピリダジル基、 ビラジニル基、 キノリル基、 キノキサリル基、 ベンゾチオフェニル基、 ベンゾイミダゾリル基、 ベンゾ トリアゾリル基、 ベンゾフラニル基等が挙げられる。

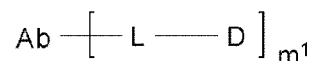
[0020] 本発明において、「6員の複素環」とは、ピリジン環、ピリミジン環、ピリダジン環等が挙げられる。

[0021] 本発明において、「スピロ結合の」とは、実施例で例示されるように、A及びAが結合するピロリジン環又はE及びEが結合するピロリジン環がスピロ環を形成することを意味する。

[0022] [抗体－薬物コンジュゲート]

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、次式で示される。

[化50]



m_1 は抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数を示し、Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、Dは薬物を示す。

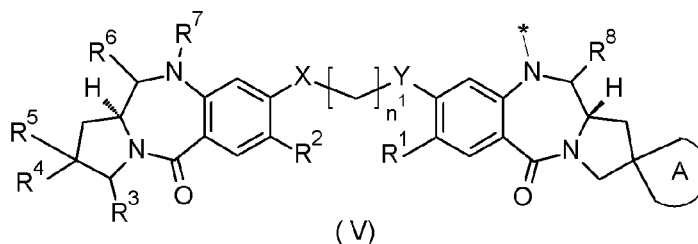
< 薬物 >

本発明の抗体－薬物コンジュゲートに結合される薬物Dについて述べる。本発明の薬物Dは抗腫瘍性化合物であることが好ましい。本抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離されて抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が本来の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおける抗腫瘍性化合物は、一般式 (V)

[0023]

[化51]



で示されるピロロベンゾジアゼピン誘導体（PBD誘導体）である。以下に説明する。

アステリスクはリンカーLと結合していることを示す。

[0024] n_1 は、2から8の整数を示し、好ましくは2から6の整数であり、より好ましくは3から5の整数である。

上記 n_1 が2から8の整数、好ましくは2から6の整数であり、より好ましくは3から5の整数で示されるアルキル鎖は二重結合を含んでいてもよい。

[0025] Aはスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環又は3～5員の飽和複素環を示し、好ましくは3～5員の飽和炭化水素環（シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン）であり、より好ましくはシクロプロパン、シクロブタンであり、最も好ましくはシクロプロパンである。

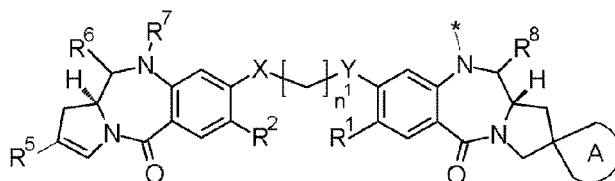
前記スピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環は1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい（例えば、2,2-ジフルオロシクロプロパン等）。

[0026] R^1 、 R^2 は、それぞれ独立して、 C_1 ～ C_6 アルコキシ基、 C_1 ～ C_6 アルキル基、水素原子、水酸基、チオール基、 C_1 ～ C_6 アルキルチオ基、ハロゲン原子又は—N R' R' ， を示し、好ましくは、 C_1 ～ C_6 アルコキシ基、 C_1 ～ C_6 アルキル基、水酸基であり、より好ましくは、 C_1 ～ C_3 アルコキシ基であり、最も好ましくは、メトキシ基である。

[0027] R^3 、 R^4 及び R^5 は、下記 (i) ～ (iii) を示す。

(i) R^3 及び R^4 は一緒になって、以下に示す通り、それぞれの基が結合する炭素原子とともに、二重結合を形成する場合、

[化52]



おは、群1から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基又はヘテロアリール基、群2から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいC₁〜C₆アルキル基を示し、好ましくは上記群1から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基である。

[0028] かの 群1から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基又はヘテロアリール基」の「アリール基」は、好ましくは、フェニル基、ナフチル基であり、より好ましくはフェニル基である。

[0029] かの 群1から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基又はヘテロアリール基」の「ヘテロアリール基」は、好ましくは、チエニル基、ピリジル基、ピリミジル基、キノリル基、キノキサリル基、ベンゾチオフェニル基であり、より好ましくは、2_チエニル基、3_チエニル基、2_ピリジル基、3_ピリジル基、4_ピリジル基であり、更に好ましくは3_ピリジル基、3_チエニル基である。

[0030] 上記R⁵のアリール基又はヘテロアリール基の置換基としては、以下、a) ~j) が挙げられる。

a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1〜C6アルコキシ基、

b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-NR' R' R'$ 、 $-C(=NR, NR', NR', NR')$ 及び $-NHC(=NR')-NR' R' R'$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよいC₁〜C₆アルキル基、

c) ハロゲン原子、

d) C3～C5シクロアルコキシ基、

e) C1~C6 アルキルチオ基、

f) - $NR' \quad R' \quad ' \quad ,$

g) $-C(=NR',)-NR' \text{ ' ' ' ' '}$ 、

h) $-NHC(=NR',)-NR' \text{ ' ' ' ' '}$ 、

i) $-NHCOR'$

j) 水酸基

ここで、b)、f) ~ i) における R' 、 $R' \text{ ' ' ' ' '}$ 、及び $R' \text{ , , }$ はそれぞれ独立して、水素原子、 C_1 ~ C_6 アルキル基を示し、好ましくは、それぞれ独立して、水素原子又は C_1 ~ C_3 アルキル基である。

[0031] a) ~ j) は、好ましくは、以下である。

a) 1~3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 ~ C_3 アルコキシ基であり、

より好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、 i -プロポキシ基、トリフルオロメトキシ基であり、更に好ましくはメトキシ基、エトキシ基、トリフルオロメトキシ基であり、最も好ましくはメトキシ基である。

b) 1~3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR',)-NR' \text{ ' ' ' ' '}$ 、 $-NHC(=NR',)-NR' \text{ ' ' ' ' '}$ で置換されていてもよい C_1 ~ C_3 アルキル基であり、 R' 、 $R' \text{ ' ' ' ' '}$ 、及び $R' \text{ , , }$ はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 ~ C_3 アルキル基であり、より好ましくは、1~3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')-NR' \text{ ' ' ' ' '}$ 、 $-NHC(=NR')-NR' \text{ ' ' ' ' '}$ 、から選択されるいずれかで置換されていてもよい C_1 ~ C_3 アルキル基であり、 R' 、 $R' \text{ ' ' ' ' '}$ 、及び $R' \text{ , , }$ はそれぞれ独立して、水素原子、メチル基であり、更に好ましくは、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、フルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシメチル基、 $-CH_2OCOMe$ 、 $-CH_2-NHC(=NH)-NH_2$ 、 $-CH_2-NHC(=NMe)-NH_2$ である。

c) ハロゲン原子であり、好ましくはフッ素原子、塩素原子である。

d) C_3 ~ C_5 シクロアルコキシ基であり、より好ましくはシクロプロポキシ基である。

e) C_1 ~ C_3 アルキルチオ基であり、より好ましくはメチルチオ基、エチルチ

オ基である。

f) $-NR'R''$ であり、 R' 及び R'' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NEt$ 、 $-NEt_2$ である。

g) $-C(=NR')-NR''R'''$ であり、 R' 、 R'' 、及び R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-C(=NH)-NH_2$ 、 $-C(=NMe)-NH_2$ である。

h) $-NHC(=NR')-NR''R'''$ であり、 R' 、 R'' 及び R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-NHC(=NH)-NH_2$ 、 $-NHC(=NMe)-NH_2$ である。

i) $-NHCOR'$ であり、 R' は、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-NHCOMe$ 、 $-NHCOEt$ であり、

j) 水酸基である。

[0032] R^6 のアリール基 (好ましくは、フェニル基) 又はヘテロアリール基 (好ましくは、ピリジル基) の置換基の位置はいずれでもよく、置換基が複数個である場合に、それらが同一であっても異なつていてもよい。

[0033] R^6 がアリール基の場合の置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、j)、より好ましくは、a)、b)、d)、j) である。

[0034] R^6 がフェニル基の場合、置換基の位置はいずれでもよく、置換基は複数個あつてもよいが、好ましくは、置換基の位置は3位又は1及び4位であり、置換基は1個または2個であり、より好ましくは、4位であり、置換基は1個である。

R^6 がナフチル基の場合、置換基の位置はいずれでもよく、置換基は複数個あつてもよいが、好ましくは、置換基の位置は6位であり、置換基は1個である。

[0035] R^6 がフェニル基の場合、より好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-エトキシフェニル基、4-(n -プロポキシ)-フェニル基、4-(i -プロポキシ)-フェニル基、4-シクロプロポキシ

シーフエニル基、4-トリフルオロメチルフエニル基、4-ヒドロキシメチルフエニル基、4-アセトキシメチルフエニル基、4-カルバムイミドアミドメチルフエニル基であり、更に好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-シクロプロポキシフェニル基、4-ヒドロキシメチルフエニル基、4-アセトキシメチルフエニル基、4-カルバムイミドアミドメチルフエニル基、4-トリフルオロメチルフエニル基である。

R⁶がナフチル基の場合、より好ましくは、ナフチル基、6-メトキシ-2-ナフチル基である。

最も好ましくは、4-メトキシフェニル基である。

[0036] R⁶がヘテロアリール基の場合の置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、j)、より好ましくは、a)、b)である。

[0037] R⁶がヘテロアリール基の場合、置換基の位置はいずれでもよいが、3-ピリジル基の場合、好ましくは、6位又は/及び5位であり、2-ピリジルの場合、好ましくは、5位又は/及び4位、又は5位又は/及び6位であり、4-ピリジルの場合、好ましくは、2位又は/及び6位である。

[0038] R⁶がヘテロアリール基の場合の置換基は複数個あってもよいが、好ましくは、1個または2個であり、好ましくは1個である。

[0039] R⁶がピリジル基の場合、好ましくは、6-メトキシ-3-ピリジル基、6-メチル-3-ピリジル基である。

R⁶が3-チエニル基又は6-キノキサリル基の場合、好ましくは、無置換である。

[0040] 該群2から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよい「C1-C6アルキル基」の「C1-C6アルキル基」は、好ましくは、C1-C3アルキル基であり、より好ましくは、メチル基、エチル基である。

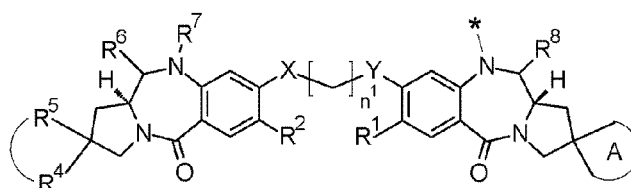
[0041] 該群2から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよい「C1-C6アルキル基」の置換基は、ハロゲン原子、水酸基、C1-C6アルコキシ基（好ましくは、C1-C3アルコキシ基）であり、好ましくは、水酸基、メトキシ基

、エトキシ基であり、より好ましくは、水酸基である。

[0042] (ii) おが、水素原子を示す場合、

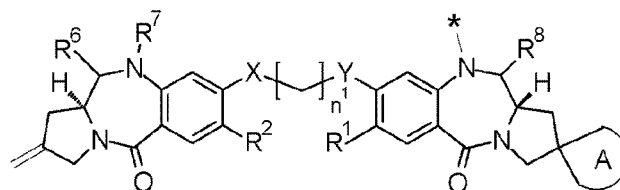
R⁴及びR⁵は、R⁴及びR⁵が結合している炭素原子と一緒にあって、以下に示す通り、3～5員の飽和炭化水素環もしくは3～5員の飽和複素環を形成するか、又はCH₂=を形成する。

[化 53]



、又は、

[化 54]



前記の3～5員の飽和炭化水素環は1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい。

R⁴及びR⁵は一緒にあって、好ましくは3～5員の飽和炭化水素環又はCH₂=を形成し、より好ましくはシクロプロパン、シクロブタン又はCH₂= (エキソメチレン基)を形成し、更に好ましくはシクロプロパンである。

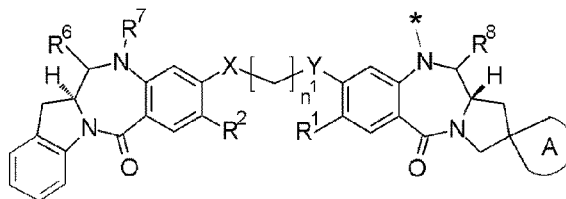
R⁴及びR⁵は一緒にあって、3～5員の飽和炭化水素環もしくは3～5員の飽和複素環を形成する場合、Aと同じ3～5員の飽和炭化水素環もしくは3～5員の飽和複素環であることが好ましい。より好ましくは、Aは3～5員の飽和炭化水素環であり、R⁴及びR⁵は一緒にあって、3～5員の飽和炭化水素環を形成し、更に好ましくは、Aはシクロプロパン環であり、R⁴及びR⁵は一緒にあってシクロプロパン環を形成する。

[0043] (iii) R³、R⁴及びR⁵が、R³が結合している炭素原子並びにR⁴及びR⁵が結合して

いる炭素原子と一緒にあって、群3から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環を形成する。

次式は、 R^3 及び R^4 と一緒にあって、1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環を形成する場合を示す。

[化55]



前記ベンゼン環又は複素環の置換基の位置はいずれでも良く、置換基が複数個である場合に、それらが同一であっても異なってもよい。

[0044] ベンゼン環又は複素環の置換基は、ハロゲン原子、1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基又は C_1 〜 C_6 アルコキシ基であり、好ましくは、ハロゲン原子、1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基又は C_1 〜 C_3 アルコキシであり、より好ましくは、ハロゲン原子、メチル基、メトキシ基である。

[0045] 「1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環」は、好ましくは、無置換のベンゼン環である。

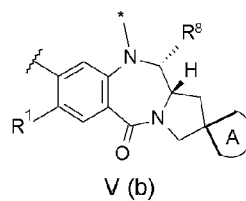
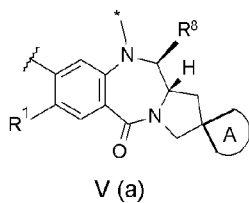
[0046] R^3 、 R^4 及び R^5 は、最も好ましくは、上記 (i) である。

[0047] R^6 、 R^7 は、共に水素原子を示すか、 R^6 及び R^7 と一緒にあって、イミン結合 ($C=N$) を示す。

[0048] R^8 は、水酸基又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基であり、好ましくは、水酸基、メトキシ基であり、より好ましくは水酸基である。おは、亜硫酸水素塩付加物 (OSO_3M (M は金属カチオンである)) でもよい。

おは、不斉炭素原子に結合しているため、下記部分構造 (Va) もしくは (Vb) で示される立体配置を有する。波線は一般式 (v) における Y と結合していることを示し、アステリスクは h と結合していることを示す。

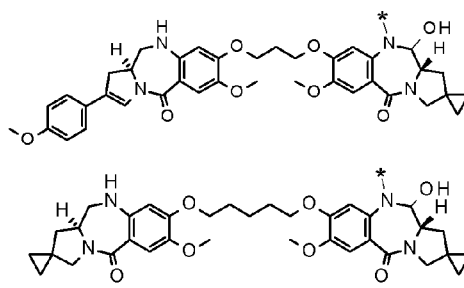
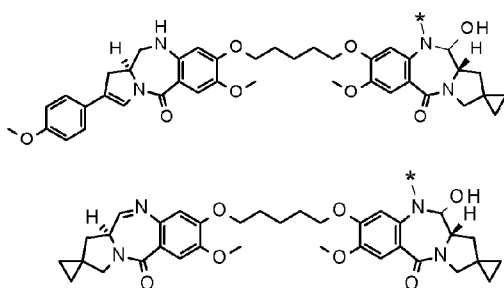
[化56]



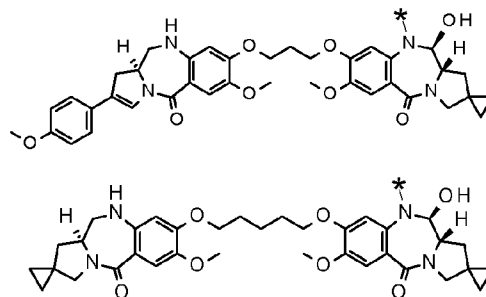
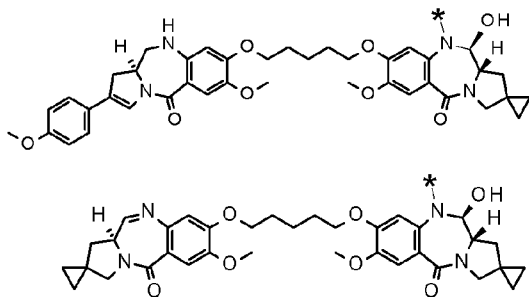
[0049] X、Yは、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子、硫黄原子であり、好ましくは、酸素原子である。

[0050] 本発明の薬物Dは、好ましくは、次の群から選ばれる1の化合物である。

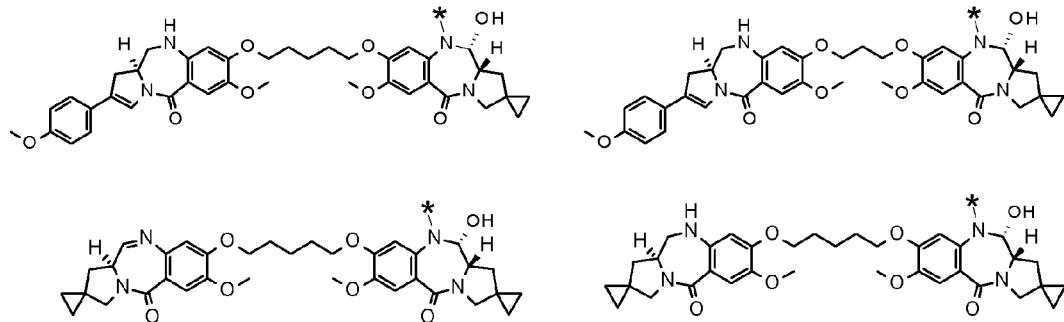
[化57]



[化58]



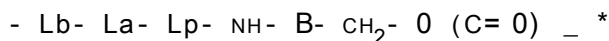
[化59]



[005 1] < リンカー構造>

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

当該リンカーLは、次式：



で示される。

アステリスクは薬物DのN10' 位の窒素原子と結合していることを示し、Lbは、LaとAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサー、又はLaと抗体Abのアミノ酸残基（例えば、システイン、リジン等）の側鎖を結合するスペーサーを示す。

[0052] Bは、フェニル基又はヘテロアリール基を示し、好ましくは、1,4_フェニル基、2,5_ピリジル基、3,6_ピリジル基、2,5_ピリミジル基、2,5_チエニル基であり、より好ましくは、1,4_フェニル基である。

[0053] Lpは、生体内又は標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示す。Lpは、例えば、エステラーゼやペプチダーゼ等の酵素の作用によって、切断される。

Lpは、2から7個（好ましくは、2から4個）のアミノ酸で構成されるペプチド残基である。すなわち、2から7個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチドの残基によって構成される。

Lpは、N末端においてLb_La_のLaのカルボニル基に結合し、C末端においてリンカーの_NH_B_CH2_O(C=O)_一部分のアミノ基(_NH_)とアミド

結合を形成する。前記エステラーゼ等の酵素によって、LpのC末端と—NH₂間の結合が切断される。

[0054] Lpを構成するアミノ酸は特に限定されることはないが、例えば、L₂又はD₂—アミノ酸であり、好ましくはL₂—アミノ酸である。また、 α —アミノ酸の他、 β —アラニン、 ϵ —アミノカプロン酸、 γ —アミノ酪酸等の構造のアミノ酸であってもよく、さらには例えばN₂-メチル化されたアミノ酸等の非天然型のアミノ酸であってもよい。

[0055] Lpのアミノ酸配列は、特に限定されないが、構成するアミノ酸として、グリシン (Gly ; G)、バリン (Val ; V)、アラニン (Ala ; A)、フェニルアラニン (Phe ; F)、グルタミン酸 (Glu ; E)、イソロイシン (Ile ; I)、プロリン (Pro ; P)、シトルリン (Cit)、ロイシン (Leu ; L)、セリン (Ser ; S)、リシン (Lys ; K) 及びアスパラギン酸 (Asp ; D) 等を挙げることができる。これらのうちで好ましくは、グリシン (Gly ; G)、バリン (Val ; V)、アラニン (Ala ; A)、シトルリン (Cit) である。

これらのアミノ酸は重複してもよく、任意に選択されたアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。また、アミノ酸の種類によって、薬物遊離のパターンをコントロールすることができる。

[0056] リンカーLpの具体例として、

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

を挙げることができる。

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

[0057] リンカーLpは、好ましくは、以下である。

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D-)P
I-、-GGPL-

[0058] リンカーLpは、より好ましくは、以下である。

-GGVA-、-GGVCit-、-VA-

[0059] Lbは、i) La と抗体Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサーか ii) Laと抗体Abのアミノ酸残基（例えば、システイン、リジン等）の側鎖を結合するスペーサーを示す。

Lbが、i) の場合、Laは、以下の群から選択されるいずれか一つを示す。

-C(=O)-(CH₂CH₂)_{n2}-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)_{n2}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)_{n3}-C(=O)-

、

-C(=O)-(CH₂CH₂)_{n2}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)_{n3}-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-(CH₂CH₂)_{n2}-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)_{n3}-CH₂CH₂-C(=O)-、-(CH₂)_{n4}-O-C(=O)-

ここで、式中、n²は1〜3の整数（好ましくは、1又は2）、n³は1〜5の整数（好ましくは、2〜4の整数、より好ましくは、2又は4）、n⁴は0〜2の整数（好ましくは、0又は1）を示す。

[0060] Lbが、i) の場合、Laは、好ましくは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-、

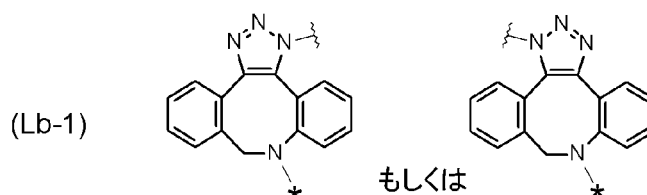
-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-O-C(=O)-、及び、-O-

C(=O)-

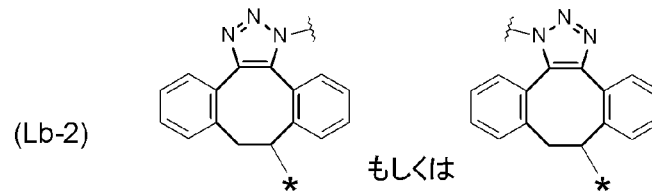
Laは、より好ましくは、-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、又は、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-である。

[0061] Lbのスペーサーは特に限定されないが、例えば、次式で示されるスペーサーが挙げられる。

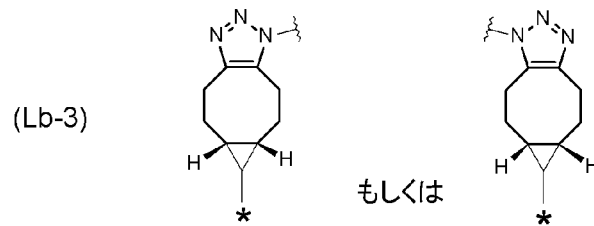
[化60]



[化61]



[化62]



上記で示されるLbのそれぞれの構造式において、アステリスクはLaの左端の—(C=O)、又は—(CH₂)ⁿ⁴と結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す。

上記で示されるLb(Lb-1、Lb-2又はLb-3)のそれぞれの構造式において、アジド基とDBC0のclick reactionで形成されるトリアゾール環部位は、幾何異性構造を有し、1つのLb中に、これら2種類の構造のいずれか一方、又は、それらの混合物として存在する。本発明の抗体_薬物コンjugate1分子中にはm¹個の『—L_D』が存在し、m¹個それぞれの『—L_D』におけるL中のそれぞれのLb(Lb-1、Lb-2又はLb-3)は、これら2種類の構造のいずれか一方、又は、その両方が混在している。

[0062] Lbが、i)の場合、Lは、好ましくは、—L_b—L_a—_p—NH—B—CH₂—O (C=O) 一水で示され、

Bは、1,4-フエニル基であり、

L_pは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

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

Laは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

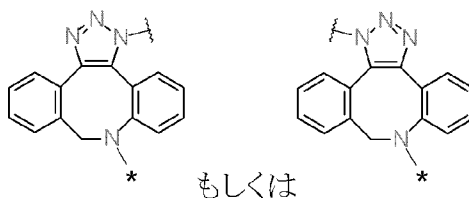
- C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) - 、 - C(=O) - (CH₂CH₂)₂- C(=O) - 、
 - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂- C(=O) - 、
 - C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂-CH₂- C(=O) - 、
 - C(=O) -CH₂CH₂-NH-C(=O) - (CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂- C(=O) - 、 -CH₂-OC(=O) - 、 -OC(=O) -
- Lbは、上記で示されるLbのいずれかの構造式を示す。

[0063] Lbが、i) の場合、Lは、より好ましくは、以下の群から選択されるいずれか一つである。

- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GG- (D-) VA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) - (CH₂CH₂)₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPI-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGFG-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVCit-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVK-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPL-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂-CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- V-C(=O) -CH₂CH₂-NH-C(=O) - (CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、
- Z²-OC(=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) - 、 - Z³-CH₂-OC(=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O) -

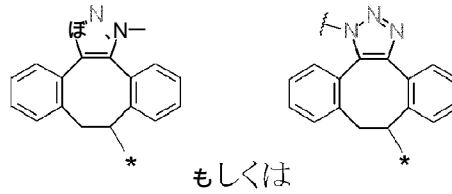
ここで、Z_iは、上記Lbの以下で示される構造式：

[化63]



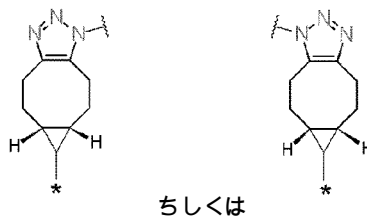
を示し、Z²は、上記Lbの以下で示される構造式：

[化64]



を示し、Z³は上記Lbの以下で示される構造式：

[化65]



を示し、Bは1,4-フェニル基である。

[0064] Lは、最も好ましくは、以下のいずれかである。

-Zi-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、

-Zi-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、

-Z'-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、

-Zi-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH₂-OC(=O)-、-Z'-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-N

H-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、

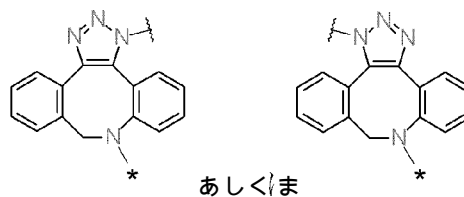
-V-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、及

び

-V-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-

ここで、Bは1,4-フェニル基であり、Z¹は上記Lbの以下で示される構造式：

[化66]

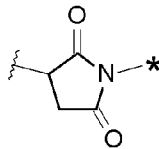


である。

[0065] Lbが、 Lb の場合、当該アミノ酸残基がシステイン残基の場合、Lbのスペーサ-は特に限定されないが、例えば、 $-(\text{Succinimid-3-y})-\text{トN})-$ が挙げられる。

『 $(\text{Succinimid-3-y})-\text{トN})-$ 』は、次式

[0066] [化67]



で示される構造を有する。上記で示される構造式において、アステリスクはL_aと結合していることを示す。波線は抗体のシステイン残基のチオール基にチオール結合を介して結合していることを示し、Site specificなシステインコンジュゲーションでも良い (RSC Adv., 2017, 7, 24828-24832 etc)。

[0067] Lbが Lb の場合、Lは $-\text{Lb}-\text{La}-\text{Lp}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ で示され、

Bは、1,4-フエニル基であり、

Lpは、 $-\text{GGVA}-$ 、 $-\text{GG}-(\text{D})-\text{VA}-$ 、 $-\text{VA}-$ 、又は $-\text{GGFG}-$ のいずれか一つを示し、

Laは、 $-(\text{CH}_2)_{n^9}-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_{n^{10}}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_{n^{11}}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

n^9 は2〜7の整数 (好ましくは、2〜5の整数、より好ましくは、2又は5)、 n^{10} は1〜3の整数 (好ましくは、1)、 n^{11} は6〜10の整数 (好ましくは、8) を示し、

Lbは、 $-(\text{Succinimid-3-y})-\text{トN})-$ を示す。

[0068] Lbが Lb の場合、Lは、好ましくは、以下のいずれかである。

$-(\text{Succinimid-3-y})-\text{トN})-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、

$-(\text{Succinimid-3-y})-\text{トN})-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、又は、

$-(\text{Succinimid-3-y})-\text{トN})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_8-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$

ここで、Bは1,4-フエニル基である。

[0069] 本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、その大部分が腫瘍細胞内に移行し

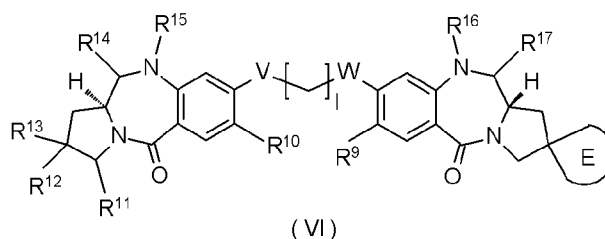
た後にリンカー部分（例えば、Lp）が酵素等によって切断され活性化されると、薬物D部分が遊離し（以下、遊離薬物（後記）という）、抗腫瘍活性を発揮すると考えられる。

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

< 遊離薬物及び製造中間体 >

本発明の抗体－薬物コンジュゲートの中間体及び遊離薬物は、次式

[0070] [化68]



で示される。以下に説明する。

[0071] 本発明の遊離薬物は腫瘍細胞内に移行した後、抗体－薬物コンジュゲートにおけるリンカーL部分が切断されて生成する。例えば、実施例45～54、150～152の薬物1～16が挙げられる。

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは本製造中間体を用いて作製される。

[0072] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおける遊離薬物は、(a) が⁶、R¹⁷は、R¹⁶及びR¹⁷が一緒になって、イミン結合（N=C）を形成する場合である。

本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおける製造中間体は、(b) R¹⁶は、J
- La' - Lp' - NH- B' - CH₂- O (C=O) - *
で示される場合である。

従って、式中、Iと前記が、Eと前記A、R⁹と前記R¹、R¹⁰と前記R²、R¹¹と前記R³、R¹²と前記R⁴、R¹³と前記R⁵、R¹⁴と前記R⁶、R¹⁵と前記R⁷、Vと前記X、Wと前記Y、群7と前記群1、群8と前記群2、群9と前記群3、群10と前記群4、群11と前記群5、群12と前記群6は同義である。

[0073] Iは、2から8の整数を示し、好ましくは2から6の整数であり、より好ましくは3から5の整数である。

上記 L が 2 から 8 の整数、好ましくは 2 から 6 の整数であり、より好ましくは 3 から 5 の整数で示されるアルキル鎖は二重結合を含んでいてもよい。

[0074] E はスピロ結合の 3-5 員の飽和炭化水素環又は 3-5 員の飽和複素環を示し、好ましくは 3-5 員の飽和炭化水素環（シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン）であり、より好ましくはシクロプロパン、シクロブタンであり、最も好ましくはシクロプロパンである。

前記スピロ結合の 3-5 員の飽和炭化水素環は 1-4 個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1 又は 2 個のフッ素原子で置換されていてもよい（例えば、2, 2-ジフルオロシクロプロパン等）。

[0075] R^9 , R^{10} は、それぞれ独立して、 C_1 - C_6 アルコキシ基、 C_1 - C_6 アルキル基、水素原子、水酸基、チオール基、 C_1 - C_6 アルキルチオ基、ハロゲン原子又は $-N(R')(R')$ を示し、好ましくは、 C_1 - C_6 アルコキシ基、 C_1 - C_6 アルキル基、水酸基であり、より好ましくは、 C_1 - C_3 アルコキシ基であり、最も好ましくは、メトキシ基である。

[0076] R^{11} , R^{12} 及び R^{13} は、下記 (i) ~ (iii) を示す。

(i) R^{11} 及び R^{12} は一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに、二重結合を形成する場合、

R^{13} は、群 7 から選ばれる 1 もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基又はヘテロアリール基、群 8 から選ばれる 1 もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 - C_6 アルキル基を示し、好ましくは上記群 7 から選ばれる 1 もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基である。

[0077] 上記群 7 から選ばれる 1 もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基又はヘテロアリール基の「アリール基」は、好ましくは、フェニル基、ナフチル基であり、より好ましくはフェニル基である。

[0078] 上記群 7 から選ばれる 1 もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基又はヘテロアリール基の「ヘテロアリール基」は、好ましくは、チエニル基、ピリジル基、ピリミジル基、キノリル基、キノキサリル基、ベンゾチオフェニル基であり、より好ましくは、2-チエニル基、3-チエニル基

、2_ ピリジル基、3_ ピリジル基、4_ ピリジル基であり、更に好ましくは3_ ピリジル基、3_ チェニル基である。

[0079] 上記R¹³のアリール基又はヘテロアリール基の置換基としては、以下、a) ~ j) が挙げられる。

- a) 1~3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC₁~C₆アルコキシ基、
- b) 1~3個のハロゲン原子、水酸基、—OCOR'、—NR' R' '、—C(=NR,) —NR' ' R' ' ' 及び—NHC(=NR') —NR' ' R' ' ' から選択されるいずれか一つで置換されていてもよいC₁~C₆アルキル基、
- c) ハロゲン原子、
- d) C₃~C₅シクロアルコキシ基、
- e) C₁~C₆アルキルチオ基、
- f) —NR' R' '、
- g) —C(=NR,) —NR' ' R' ' '、
- h) —NHC(=NR,) —NR' ' R' ' '、
- i) —NHCOR'、
- j) 水酸基

ここで、b)、f) ~ i) におけるR'、R' '、及びR' , , はそれぞれ独立して、水素原子、C₁~C₆アルキル基を示し、好ましくは、それぞれ独立して、水素原子又はC₁~C₃アルキル基である。

[0080] a) ~ j) は、好ましくは、以下である。

a) 1~3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC₁~C₃アルコキシ基であり、

より好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、n—プロポキシ基、i_ プロポキシ基、トリフルオロメトキシ基であり、

更に好ましくはメトキシ基、エトキシ基、トリフルオロメトキシ基であり、最も好ましくはメトキシ基である。

b) 1~3個のハロゲン原子、水酸基、—OCOR'、—C(=NR,) —NR' ' R' ' ' , , 、—NHC(=NR') —NR' ' R' ' ' から選択されるいずれかで置換され

ていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基であり、 R' 、 R'' 、及び R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、

より好ましくは、1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR,)-NR''-R'''$ 、 $-NHC(=NR,)-NR''-R'''$ で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基であり、 R' 、 R'' 、及び R''' はそれぞれ独立して、水素原子、メチル基であり、

更に好ましくは、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、フルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシメチル基、 $-CH_2OCOMe$ 、 $-CH_2-NHC(=NH)-NH_2$ 、 $-CH_2-NHC(=NMe)-NH_2$ である。

c) ハロゲン原子であり、好ましくはフッ素原子、塩素原子である。

d) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基であり、より好ましくはシクロプロポキシ基である。

e) C_1 〜 C_3 アルキルチオ基であり、より好ましくはメチルチオ基、エチルチオ基である。

f) $-NR''-R'''$ であり、 R' 及び R'' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、

より好ましくは、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NHEt$ 、 $-NEt_2$ である。

g) $-C(=NR,)-NR''-R'''$ であり、 R' 、 R'' 、及び R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、

より好ましくは、 $-C(=NH)-NH_2$ 、 $-C(=NMe)-NH_2$ である。

h) $-NHC(=NR')-NR''-R'''$ であり、 R' 、 R'' 、及び R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、

より好ましくは、 $-NHC(=NH)-NH_2$ 、 $-NHC(=NMe)-NH_2$ である。

i) $-NHCOR'$ であり、

R' は、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基であり、

より好ましくは、 $-NHCOMe$ 、 $-NHCOEt$ であり、

j) 水酸基である。

[0081] R^{13} のアリール基 (好ましくは、フェニル基) 又はヘテロアリール基 (好ましくは、ピリジル基) の置換基の位置はいずれでもよく、置換基が複数個である場合に、それらが同一であっても異なってもよい。

[0082] R^{13} がアリール基の場合の置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、j)、より好ましくは、a)、b)、d)、j) である。

[0083] R^{13} がフェニル基の場合、置換基の位置はいずれでもよく、置換基は複数個あってもよいが、好ましくは、置換基の位置は3位又は/及び4位であり、置換基は1個または2個であり、より好ましくは、4位であり、置換基は1個である。

R^{13} がナフチル基の場合、置換基の位置はいずれでもよく、置換基は複数個あってもよいが、好ましくは、置換基の位置は6位であり、置換基は1個である。

[0084] R^{13} がフェニル基の場合、より好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-エトキシフェニル基、4- $(n$ -プロポキシ)-フェニル基、4- $(i$ -プロポキシ)-フェニル基、4-シクロプロポキシフェニル基、4-トリフルオロメチルフェニル基、4-ヒドロキシメチルフェニル基、4-アセトキシメチルフェニル基、4-カルバミドアミドメチルフェニル基であり、

更に好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-シクロプロポキシフェニル基、4-ヒドロキシメチルフェニル基、4-アセトキシメチルフェニル基、4-カルバミドアミドメチルフェニル基、4-トリフルオロメチルフェニル基である。

R^{13} がナフチル基の場合、より好ましくは、ナフチル基、6-メトキシ-2-ナフチル基である。

最も好ましくは、4-メトキシフェニル基である。

[0085] R^{13} がヘテロアリール基の場合の置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、j)、より好ましくは、a)、b) である。

R^{13} がヘテロアリール基の場合、置換基の位置はいずれでもよいが、3-ピリ

ジル基の場合、好ましくは、6位又は/及び5位であり、2-ピリジルの場合、好ましくは、5位又は/及び4位、又は5位又は/及び6位であり、4-ピリジルの場合、好ましくは、2位又は/及び6位である。

R^{13} がヘテロアリール基の場合の置換基は複数個あってもよいが、好ましくは、1個または2個であり、好ましくは1個である。

R^{13} がピリジル基の場合、好ましくは、6-メトキシ-3-ピリジル基、6-メチル-3-ピリジル基である。

R^{13} が3-チエニル基又は6-キノキサリル基の場合、好ましくは、無置換である。

[0086] R^{13} の群8から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいC1-C6アルキル基」の「C1-C6アルキル基」は、好ましくは、C1-C3アルキル基であり、より好ましくは、メチル基、エチル基である。

R^{13} の群8から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいC1-C6アルキル基」の置換基は、ハロゲン原子、水酸基、C1-C6アルコキシ基（好ましくは、C1-C3アルコキシ基）であり、好ましくは、水酸基、メトキシ基、エトキシ基であり、より好ましくは、水酸基である。

[0087] (ii) R^{11} が、水素原子を示す場合、

R^{12} 及び R^{13} は、 R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒にあって、3-5員の飽和炭化水素環もしくは3-5員の飽和複素環を形成するか、又は $CH_2=$ を形成する。

前記の3-5員の飽和炭化水素環は1-4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい。

R^{12} 及び R^{13} は一緒にあって、好ましくは3-5員の飽和炭化水素環又は $CH_2=$ を形成し、より好ましくはシクロプロパン、シクロブタン又は $CH_2=$ （エキソメチレン基）を形成し、更に好ましくはシクロプロパンである。

R^{12} 及び R^{13} は一緒にあって、3-5員の飽和炭化水素環もしくは3-5員の飽和複素環を形成する場合、Eと同じ3-5員の飽和炭化水素環もしくは3-5員の飽和複素環であることが好ましい。より好ましくは、Eは3-5員の飽和炭化水素

環であり、 R^{12} 及び R^{13} は一緒になって、3～5員の飽和炭化水素環を形成し、更に好ましくは、Eはシクロプロパン環であり、 R^{12} 及び R^{13} は一緒になってシクロプロパン環を形成する。

[0088] (iii) R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} が、 R^{11} が結合している炭素原子並びに R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒に、群9から選ばれる1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環を形成する。

前記ベンゼン環又は複素環の置換基の位置はいずれでも良く、置換基が複数個である場合に、それらが同一であっても異なってもよい。

ベンゼン環又は複素環の置換基は、ハロゲン原子、1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 ～ C_6 アルキル基又は C_1 ～ C_6 アルコキシ基であり、好ましくは、ハロゲン原子、1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 ～ C_3 アルキル基又は C_1 ～ C_3 アルコキシであり、より好ましくは、ハロゲン原子、メチル基、メトキシ基である。

「1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環」は、好ましくは、無置換のベンゼン環である。

[0089] R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} は、最も好ましくは、上記 (i) である。

[0090] R^{14} 、 R^{15} は、共に水素原子を示すか、 R^{14} 及び R^{15} が一緒になって、イミン結合 ($C=N$) を示す。

[0091] V、Wは、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子、硫黄原子であり、好ましくは、酸素原子である。

[0092] R^{16} 、 R^{17} は、

(a) が、 R^{17} は、 R^{16} 及び R^{17} が一緒になって、イミン結合 ($N=C$) を形成する、又は、

(b) R^{16} は、 $J-La'-Lp'-NH-B'-CH_2-O(C=O)-^*$ を示し、 R^{17} は、水酸基又は C_1 ～ C_3 アルコキシ基で示される。

[0093] 上記 (b) R^{16} が、 $J-La'-Lp'-NH-B'-CH_2-O(C=O)-^*$ の場合、式中、アステリスクは、上記式で示されるピロロベンゾジアゼピン環の $N_{10'}$ 位に結合していることを示す。

[0094] B' は、フェニル基又はヘテロアリール基を示し、好ましくは、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、2,5-チエニル基であり、より好ましくは、1,4-フェニル基である。

[0095] Lp' は、生体内又は標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示す。Lpは、例えば、エステラーゼやペプチダーゼ等の酵素の作用によって切断される。

[0096] リンカーLp' の具体例として、

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D-)PI-、-GGPL-、-EGGVA-、-PI-、-GGF-、-DGGF-、-(D-)D-GGF-、-EGGF-、-SGGF-、-KGGF-、-DGGFG-、-GGFGG-、-DDGGFG-、-KDGGFG-、-GGFGGGF-を挙げることができる。

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

[0097] リンカーLp' は、好ましくは、以下である。

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

より好ましくは、-GGVA-、-GGVCit-、-VA-を挙げることができる。

[0098] La' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示す。

-C(=O)-(CH₂CH₂)^{n⁶}-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)^{n⁶}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)^{n⁷}-C(=O)-

、

-C(=O)-(CH₂CH₂)_nS-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)^{n⁸}-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-(CH₂CH₂)_{ns}-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)_{n⁷}-CH₂CH₂-C(=O)-、-(CH₂)_{ns}-O-C(=O)-

、

-(CH₂)_{n¹²}-C(=O)-、及び、-(CH₂CH₂)^{n⁸}-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)_{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)-

ここで、式中、n⁶は1〜3の整数（好ましくは、1又は2）、n⁷は1〜5の整数（好ましくは、2〜4の整数、より好ましくは、2又は4）、n⁸は0〜2の整数（好ましくは、0又は1）、n¹²は2〜7の整数（好ましくは、2〜5の整数、より好ましくは、2又は5）、n¹³は1〜3の整数（好ましくは、1）、n¹⁴は6〜10の整数（好

ましくは、8) を示す。

[0099] La' は、好ましくは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、-OC(=O)-

、

-(CH₂)₂-C(=O)-、-(CH₂)₅-C(=O)-、及び、

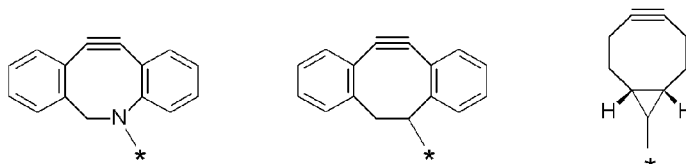
-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₈-CH₂CH₂-C(=O)-

[0100] La' は、より好ましくは、-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-

、又は-(CH₂)₅-C(=O)-である。

[0101] Jは、アジド基と反応し、1,2,3-トリアゾール環を形成するアルキン構造を含む環状構造であれば、特に限定されないが、例えば、次式で示される化合物が挙げられる。

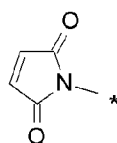
[化69]



[0102] 上記で示されるJのそれぞれの構造式において、アステリスクはLa'の左端の-C(=O)又は-(CH₂)_nと結合していることを示す。

[0103] 又は、Jは、抗体Abのアミノ酸残基（例えば、システイン、リジン等）の側鎖と結合する化合物又はハロゲン原子でもよく、例えば、次式で示されるマレイミジル基が挙げられる。

[化70]



上記で示されるマレイミジル基において、アステリスクはLa'の左端の-C(=O)又は-(CH₂)_nと結合していることを示す。

$H_2) n_2$ 、又は $-(CH_2CH_2) n_3$ と結合していることを示す。

[01 04] J^6 は、好ましくは、 $J-La' -Lp' -NH-B' -CH_2-O(C=O)-*$ で示され、

B' は、1,4-フェニル基であり、

Lp' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

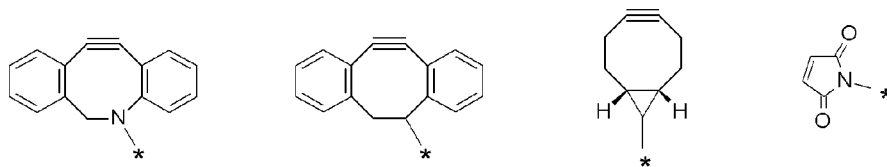
$-GGVA-$ 、 $-GG-(D-)VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ 、 $-GGPI-$ 、 $-GGVCit-$ 、 $-GGVK-$ 、 $-GG(D-PI-$ 、 $-GGPL-$

La' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-CH_2OC(=O)-$ 、
 $-(CH_2)_5-C(=O)-$ 、及び、 $-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-$

J は、以下で示されるいずれかの構造式を示し、

[化 71]



ここで、 J の構造式において、アステリスクは La' と結合していることを示す。

[01 05] R^{16} は、より好ましくは、以下の群から選択されるいずれか一つである。

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGPL-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

,

J^2 -OC(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、 J^3 -CH₂-OC(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)

) -、

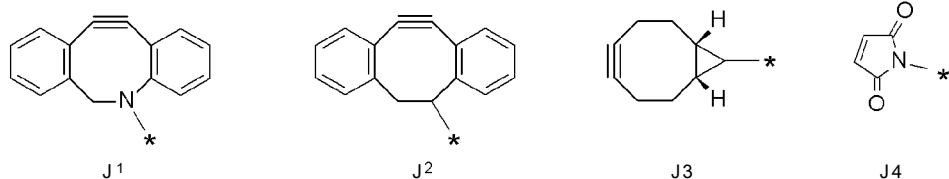
J^4 -(CH₂)₅-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^4 -(CH₂)₅-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、及び

J^4 -CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₈-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

ここで、 J 、 J^2 、 J^3 、 J^4 は以下で示される構造式を示し、

[化72]



ここで、 J 、 J^2 、 J^3 及び J^4 の構造式において、アステリスクは J^1 、 J^2 、 J^3 又は J^4 に隣接する基と結合していることを示し、

B' は1,4-フェニル基である。

[0106] R¹⁶は、最も好ましくは、以下のいずれかである。

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

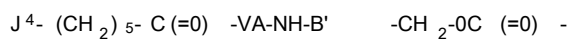
J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVCit-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₂-CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

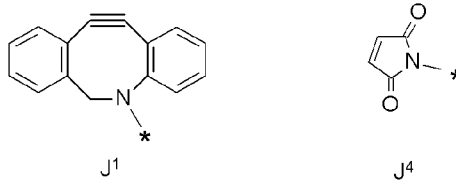
,



ここで、B' は 1,4-フェニル基であり、

J¹、J⁴は上記の以下で示される構造式：

[化 73]



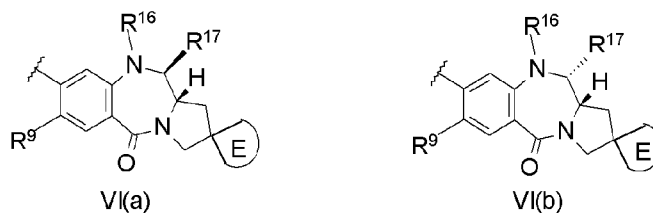
ここで、J¹及びJ⁴の構造式において、アステリスクはJ¹又はJ⁴に隣接する基と結合していることを示す。

[01 07] R¹⁷は、水酸基又はC1〜C3アルコキシ基であり、好ましくは、水酸基、メトキシ基である。

R¹⁷は、亜硫酸水素塩付加物（OSO₃M（Mは金属カチオンである））でもよい。

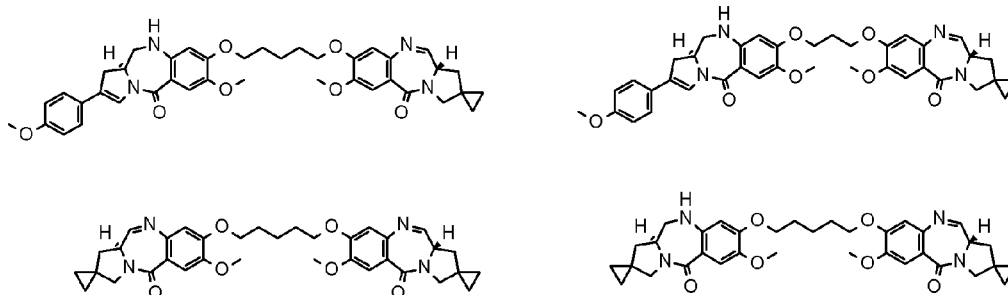
R¹⁷は、不斉炭素原子に結合しているため、下記部分構造（Via）もしくは（Vib）で示される立体配置を有する。波線は一般式（VI）で表される中間体及び遊離薬物におけるWと結合していることを示す。

[化 74]



[01 08] 遊離薬物は、好ましくは、次の群から選ばれる1の化合物である。

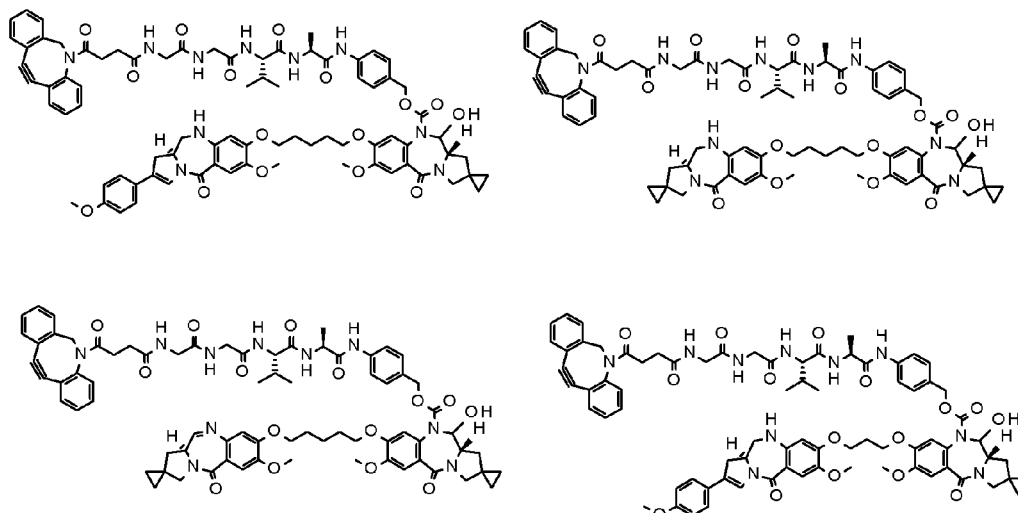
[化 75]



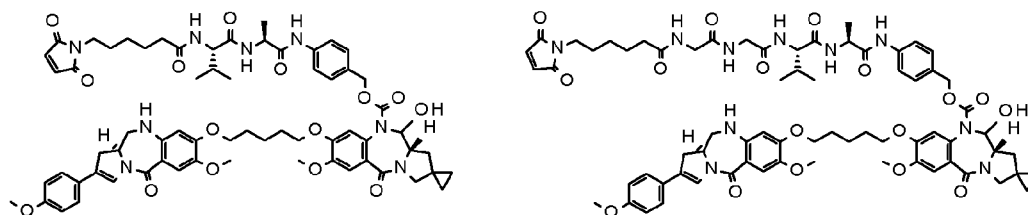
[01 09] 本遊離薬物は、リンカーLの一部が結合した状態で腫瘍細胞内において遊離する場合もあるが、かかる状態でも優れた抗腫瘍効果が発揮される優れた薬物である。本遊離薬物は、腫瘍細胞に移行した後、更に酸化されてR¹⁶、R¹⁷が脱水素することもあるが、かかる状態でも優れた抗腫瘍効果を発揮する。

[01 10] 製造中間体は、好ましくは、次の群から選ばれる1の化合物である。

[化 76]

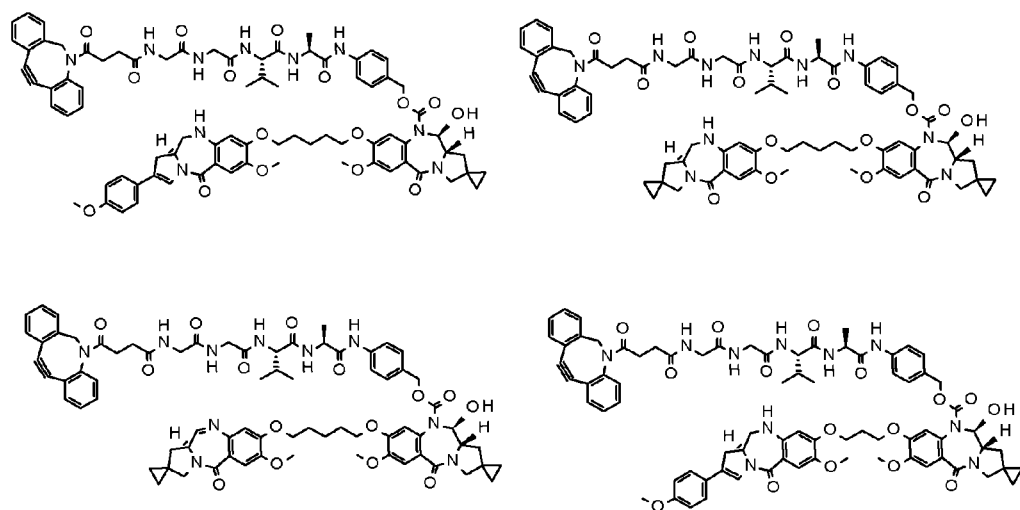


[化 77]

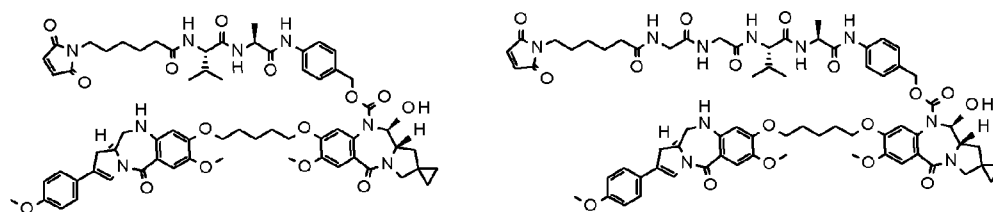


[01 11] 製造中間体は、好ましくは、次の群から選ばれる1の化合物である。

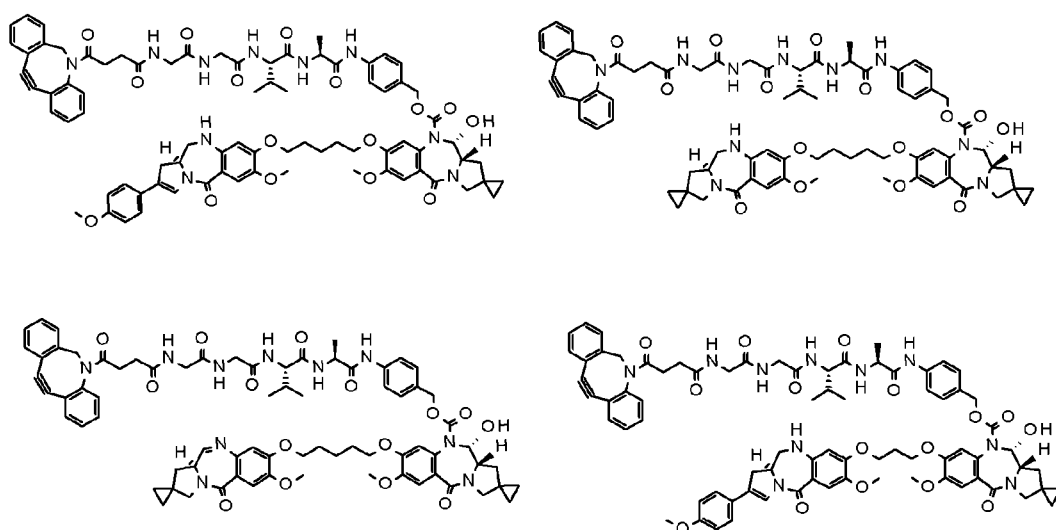
[化78]



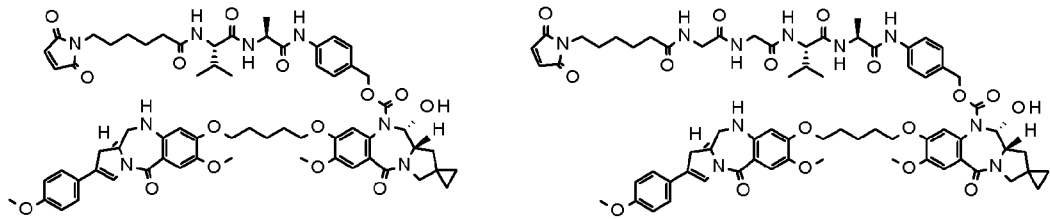
[化79]



[化80]



[化81]



[01 12] < 抗体 >

本発明において、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

本発明において、「遺伝子」とは、蛋白質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列が含まれるヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列、またはその相補鎖を意味し、例えば、蛋白質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列が含まれるヌクレオチド配列またはその相補鎖であるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、mRNA、cDNA、RNA等は「遺伝子」の意味に含まれる。本発明の「CLDN6遺伝子」としては、例えば、CLDN6蛋白質のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が含まれるDNA、mRNA、cDNA、cRNA等をあげることができる。

本発明において、「ヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド配列」と「核酸」は同義であり、例えば、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プライマー等も「ヌクレオチド」又は「ヌクレオチド配列」の意味に含まれる。

本発明においては、「ポリペプチド」、「ペプチド」、「蛋白質」は区別せずに用いている。

本発明において、「CLDN6」は、CLDN6蛋白質と同じ意味で用いている。

[01 13] 本発明において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

本発明において、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。

[0114] 本発明において、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、diabody、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、F(ab')₂を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるFab'も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

本発明の機能性断片は、IgG重鎖のFc領域においてよく保存されたN結合型糖鎖による修飾を受けるアスパラギン酸(Asn297)及びその周辺のアミノ酸を保持し、且つ抗原との結合能を有している機能性断片を含む。

[0115] 本発明において、「エピトープ」とは、特定の抗体(例えば、抗CLDN6抗体)が結合する抗原の部分ペプチド又は部分立体構造(例えば、CLDN6の部分ペプチド又は部分立体構造)を意味する。前記の部分ペプチド(例えば、CLDN6の部分ペプチド)であるエピトープは免疫アッセイ法等当業者にはよく知られている方法によって、決定することができる。

[0116] 本発明におけるrCDRjとは、相補性決定領域(CDR: Complementarity determining region)を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所のCDRがあることが知られている。CDRは、超可変領域(hypervariable region)とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0117] 本発明において、「ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする」と

は、市販のハイブリダイゼーション溶液 ExpressHyb Hybridization Solution (クロンテック社) 中、68℃でハイブリダイズすること、又はDNAを固定したフィルターを用いて0.7-1.0MのNaCl存在下68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1-2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度SSCとは150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる)を用い、68℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

本発明において、「1〜数個」とは、1〜10個、1〜9個、1〜8個、1〜7個、1〜6個、1〜5個、1〜4個、1〜3個又は1〜2個を意味する。

[01 18] 本発明において、CLDN6もしくはCLDN6及びCLDN9を認識する又は結合する抗体を、それぞれ「抗CLDN6抗体」、「抗CLDN6/CLDN9抗体」と標記することがある。かかる抗体には、キメラ化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等が含まれる。CLDN6及びCLDN9を認識する又は結合する抗体を、「抗CLDN6抗体」と標記することもある。

[01 19] 本発明の抗体-薬物コンjugateに使用される抗体は、免疫グロブリンを意味し、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子である。本発明の抗体として、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgYのいずれのクラスでもよいが、IgGが好ましい。また、サブクラスとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2のいずれであってもよいがIgG1、IgG2、IgG4が好ましい。IgG1又はIgG4を用いる場合は、定常領域のアミノ酸残基の一部を置換することによって、エフェクター機能を調整することが可能である(WO88/07089、WO94/28027、WO94/29351参照)。

抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウス及びウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体には、ラット抗体、マウス抗体、ウサギ抗体等の非ヒト動物由来のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒ

ト化抗体、ヒト抗体、それらの機能性断片、又はそれらの修飾体が含まれる。

[01 20] 本発明の抗体は、好ましくは腫瘍細胞を標的にできる抗体である。すなわち抗腫瘍活性を有する薬物をリンカーを介して結合させることから、抗体としては、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性、さらには腫瘍細胞を傷害する特性の一又はそれ以上の特性を備えていることが好ましい。

抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、(1) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアツセイ（Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761）、(2) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアツセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）又は(3) 治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab—ZAPアツセイ（Bio Techniques 28:162-165, January 2000）を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテリア毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合蛋白質蛋白質も使用可能である。

本発明において、「高い内在化能」とは、当該抗体とサボリン標識抗マウス又はラットIgG抗体を添加した標的抗原発現細胞（例えば、CLDN6発現細胞）の生存率（抗体未添加時の細胞生存率を100%とした相対率で表したもの）が、好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下であることを意味する。

[01 21] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞傷害性を腫瘍細胞において特異的・選択的に発揮させる目的からは、抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質を有することが重要であり、好ましい。抗腫瘍効果の発揮の点からは抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質を有することが、薬物によって腫瘍細胞を

特異的・選択的に傷害を与える点で重要であり、好ましい。抗体の抗腫瘍活性は、腫瘍細胞への細胞傷害活性、抗細胞効果をいう。公知の *in vitro* 又は *In vivo* の評価系を用いて、抗腫瘍活性を確認することができる。

このような抗体として、腫瘍関連抗原に対する抗体が挙げられ、抗 CLDN6 抗体、抗 CLDN6/CLDN9 抗体、抗 HER2 抗体、抗 DLL3 (Delta like protein3) 抗体、抗 A33 抗体、抗 CanAg 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD70 抗体、抗 CD98 抗体、抗 TR0P2 抗体、抗 CEA 抗体、抗 Cripto 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 FGFR2 抗体 (WO201315206 等)、抗 G250 抗体、抗 MUC1 抗体 (WO2011012309 等)、抗 GPNMB 抗体、抗 Integrin 抗体、抗 P-SMA 抗体、抗 Tenascin_C 抗体、抗 SLC44A4 抗体、抗 Mesothelin 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 DR5 抗体を例示できるがこれに限らない。

本発明の抗体として、好ましくは、抗 CLDN6 抗体、抗 CLDN6/CLDN9 抗体、抗 HER2 抗体、抗 CD98 抗体、抗 TR0P2 抗体であり、さらに好ましくは抗 CLDN6 抗体、抗 HER2 抗体 (例えば、Trastuzumab、Trastuzumab 変異体) である。

[01 22] 本発明の抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

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

なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

[01 23] 本発明のキメラ抗体、ヒト化抗体は公知の方法 (例えば、Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984)、Nature(1986)321, p. 522-525、WO90/07861

) に従って取得することができる。

[0 124] 抗 HER2 抗体 (米国特許第 5, 821, 337 号等)、抗 TR0P2 抗体 (WO2003/07456 6 等)、抗 CD98 抗体 (WO2015/146132 等) は、公知の手段によって取得することができる。

[0 125] 以下に、本発明において使用される抗 CLDN6 抗体について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0 126] 1. CLDN6 及び CLDN9

CLDN6 は、C Claudin ファミリーに属する、220 アミノ酸からなる 4 回膜貫通型の蛋白質であり、N 末端及び C 末端を細胞内に持つ。

ヒト CLDN6 のアミノ酸配列及び DNA 配列は公的データベース上に公開されており、例えば NP_067018 (配列番号 1 (図 11))、NM_021195 (配列番号 2 (図 11)) (ともに NCBI) 等のアクセッション番号により参照可能である。

ヒト CLDN6 蛋白質のアミノ酸配列 (以下、「CLDN6 アミノ酸配列」) について、細胞外領域は、配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 29～81 からなる細胞外ドメイン (EC1)、アミノ酸番号 138～160 からなる細胞外ドメイン (EC2) で構成されている。

CLDN9 は、C Claudin ファミリーに属する、217 アミノ酸からなる 4 回膜貫通型の蛋白質であり、N 末端及び C 末端を細胞内に持つ。CLDN9 は CLDN6 と高い相同性をもつ。

ヒト CLDN9 のアミノ酸配列及び DNA 配列は公的データベース上に公開されており、例えば NP_066192 (配列番号 3 (図 12))、NMJ20982 (配列番号 4 (図 12)) (ともに NCBI) 等のアクセッション番号により参照可能である。

[0 127] 2. 抗 CLDN6 抗体

本発明の抗 CLDN6 抗体の一例として、配列表の配列番号 1 に示す CLDN6 の N 末端より 29 から 81 番目のアミノ酸配列、及び 138 から 160 番目のアミノ酸配列の 2 つの細胞外領域からなる高次構造を認識し、かつ内在化活性を有する抗 CLDN6 抗体を挙げることができる。

本発明の抗CLDN6抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、すなわち腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、そして腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性等を備えている。したがって、本発明の抗CLDN6抗体と抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体－薬物コンジュゲートとすることができる。

本発明の抗CLDN6抗体は抗腫瘍活性を有していてもよい。

[01 28] 抗CLDN6抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。CLDN6が4回膜貫通型の蛋白質であることから、立体構造を保持した蛋白質を抗原として用いることができ、そのような方法として、細胞免疫法を挙げることができる。

また、前記公知の方法に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

[01 29] 以下、具体的にCLDN6に対する抗体の取得方法を説明する。

1) 抗原の調製

CLDN6は、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用するが、あるいは当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができる。また、CLDN6をin vitro (例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム (RTS)) にて合成する、あるいは遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

遺伝子操作では、具体的には、CLDN6のcDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換してCLDN6を発現させることによって、抗原を得ることができる。また、前記の遺伝子操作によるCLDN6発現細胞、あるいはCLDN6を発現している細胞株をCLDN6蛋白質として使用することも可能である。

膜蛋白質であるCLDN6の細胞外領域と抗体の定常領域とを連結した融合蛋白

質を適切な宿主・ベクター系において発現させることによって、分泌蛋白質として抗原を得ることも可能である。

上記に述べた形質転換体自体を抗原として使用することも可能である。

さらに、CLDN6を発現する細胞株を抗原として使用することも可能である。このような細胞株としては、ヒト膵癌細胞株NOR—P1細胞、ヒト卵巣癌株NIH :OVCA—3、OV—90、又は0AW28、ヒト卵巣奇形種細胞株PA—1、ヒト肝臓癌株HuH—7、ヒト妊娠性絨毛癌株JEG—3、並びにヒト多能性胎生期癌株NTERA—2 clone D1を挙げることができるが、CLDN6を発現する限り、これらの細胞株に限定されない。

本発明で用いるCLDN9蛋白質も同様に調製して使用することができる。

2) 抗CLDN6モノクローナル抗体の製造

本発明で使用される抗CLDN6抗体は、特に制限はないが、例えば、本願の配列表で示されたアミノ酸配列で特定される抗体を好適に使用することができる。本発明において使用される抗CLDN6抗体としては、以下の特性を有するものが望ましい。

(1) 以下 (a) 及び (b) の特性を有することを特徴とする抗体；

(a) CLDNファミリーを認識又は結合する。

本発明の抗体はCLDNファミリーを認識する。言い換えれば、本発明の抗体はCLDNファミリーに結合する。本発明の抗体は、好ましくはCLDN6に結合し、より好ましくは、CLDN6に特異的に結合する。更に、本発明の抗体はCLDN9を認識し又はCLDN9に結合してもよい。

本発明において「特異的な認識」、すなわち「特異的な結合」とは、非特異的な吸着ではない結合を意味する。結合が特異的であるか否かの判定基準としては、例えば、解離定数 (Dissociation Constant :以下、「 K_D という」) をあげることができる。本発明の好適な抗体のCLDN6及び/又はCLDN9に対する K_D 値は $1 \times 10^{-5}M$ 以下、 $5 \times 10^{-6}M$ 以下、 $2 \times 10^{-6}M$ 以下または $1 \times 10^{-6}M$ 以下、より好適には $5 \times 10^{-7}M$ 以下、 $2 \times 10^{-7}M$ 以下または $1 \times 10^{-7}M$ 以下である。

本発明における抗原と抗体の結合は、ELISA法、RIA法、Surface Plasmo

n Resonance (以下、「SPR」という)解析法等により測定または判定することができる。細胞表面上に発現している抗原と抗体との結合は、フローサイトメトリー法等により測定することができる。

(b) CLDN6 及び / 又は CLDN9 と結合することによつて CLDN6 及び / 又は CLDN9 発現細胞に内在化する活性を有する。

(2) CLDN6 及び / 又は CLDN9 がヒト CLDN6 及び / 又はヒト CLDN9 である上記 (1) に記載の抗体。

[0 130] 本発明の CLDN6 に対する抗体の取得方法は、通常、下記のような工程を経るが、これに限定されない。

(ハイブリドーマを用いる方法)

(a) 抗原として使用する生体高分子の精製、又は抗原発現細胞の調製、及び当該生体高分子又は抗原発現細胞の動物への投与、

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

(c) 骨髓腫細胞 (以下「ミエローマ」という) (例えば、マウスミエローマ SP2/0 — ag 14 細胞) の調製、

(d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、

(e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、

(f) 単一細胞クローンへの分割 (クローニング)、

(g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、

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

ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、フローサイトメトリー又は Cell-ELISA 法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。

[0 13 1] このようにして取得されたモノクローナル抗 CLDN6 抗体の例としては、マウス抗 CLDN6 抗体 B1 及び C7 を挙げることができる。なお、本発明においては、当該「B1」を「B1抗体」、当該「C7」を「C7抗体」と表記することもある。

B1抗体の重鎖可変領域の塩基配列は、配列表の配列番号20（図19）に、アミノ酸配列は配列番号21（図19）に記載されている。また、B1抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列表の配列番号18（図18）に、アミノ酸配列は配列番号19（図18）に記載されている。

B1抗体のCDRH1のアミノ酸配列は配列番号9（図15）に、CDRH2のアミノ酸配列は配列番号10（図15）に、CDRH3のアミノ酸配列は配列番号11（図15）に、CDRL1のアミノ酸配列は配列番号5（図13）に、CDRL2のアミノ酸配列は配列番号6（図13）に、CDRL3のアミノ酸配列は配列番号7（図13）に記載されている。

C7抗体の重鎖可変領域の塩基配列は、配列表の配列番号24（図21）に、アミノ酸配列は配列番号25（図21）に記載されている。また、C7抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列表の配列番号22（図20）に、アミノ酸配列は配列番号23（図20）に記載されている。

C7抗体のCDRH1のアミノ酸配列は配列番号15（図17）に、CDRH2のアミノ酸配列は配列番号16（図17）に、CDRH3のアミノ酸配列は配列番号17（図17）に、CDRL1のアミノ酸配列は配列番号12（図16）に、CDRL2のアミノ酸配列は配列番号13（図16）に、CDRL3のアミノ酸配列は配列番号14（図16）に記載されている。

[0132] さらに、「抗CLDN6抗体の製造」(a)～(h)の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合や他の方法によって別途にモノクローナル抗体を取得した場合においても、B1抗体又はC7抗体と同等の内在化活性を有する抗体を取得することが可能である。このような抗体の一例として、B1抗体又はC7抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、B1抗体又はC7抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体がB1抗体又はC7抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、B1抗体又はC7抗体のCLDN6に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体が、B1抗体又はC7抗体とCLDN6の結合

を妨げる)ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体が抗CLDN6抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体がB1抗体又はC7抗体と同等の抗原結合能、生物活性及び/又は内在化活性を有していることが強く期待される。

[0133] 本発明の抗体には、上記CLDN6に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体、ヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

(1) キメラ抗体

キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984) 参照)。

本発明のキメラ抗体として例示されるマウス抗ヒトCLDN6抗体B1抗体由来のキメラ抗体は、配列番号21(図19)に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖及び配列番号19(図18)に示される軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗体であり、任意のヒト由来の定常領域を有してよい。

マウス抗ヒトCLDN6抗体B1抗体由来のキメラ抗体の具体例として、マウス抗ヒトCLDN6抗体B1抗体由来のキメラ抗体chB1抗体(以下、「chB1」とも記載する。)を挙げることができる。chB1抗体のアミノ酸配列は、配列表の配列番号32(図24)の20~471番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する重鎖及び配列表の配列番号28(図22)の21~234からなるアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体を挙げることができる。

なお、配列表の配列番号32(図24)に示される重鎖配列中で、1~19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20~141番目のア

ミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域であり、142～471番目の残基からなるアミノ酸配列は重鎖定常領域である。また、配列表の配列番号28（図22）に示される軽鎖配列中で、1～20番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21～127番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、128～234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖定常領域である。

chB1抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号34（図25）、配列番号30（図23）に記載されている。

chB1抗体の重鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号33（図24）に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。配列表の配列番号33に示されるヌクレオチド配列の1～57番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はchB1抗体重鎖のシグナル配列をコードしており、配列表の配列番号33に示されるヌクレオチド配列の58～423番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はchB1抗体の重鎖可変領域をコードしており、配列表の配列番号33に示されるヌクレオチド配列の424～1413番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はchB1抗体の重鎖定常領域をコードしている。

chB1抗体の重鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号35（図25）に記載されている。

chB1抗体の軽鎖アミノ酸配列は、配列表の配列番号29（図22）に示されるヌクレオチド配列によってコードされている。配列表の配列番号29に示されるヌクレオチド配列の26～85番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はchB1抗体軽鎖のシグナル配列をコードしており、配列表の配列番号29に示されるヌクレオチド配列の86～406番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はchB1抗体の軽鎖可変領域をコードしており、配列表の配列番号29に示されるヌクレオチド配列の407～727番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列はchB1抗体の軽鎖定常領域をコードしている。

chB1抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は配列表の配列番号31（図23）に記載されている。

(2) ヒト化抗体

ヒト化抗体としては、相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体 (Nature (1986) 321, p. 522-525 参照)、CDR移植法によって、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体 (WO90/07861号)、更に、抗原に対する結合能を維持しつつ、一部のCDRのアミノ酸配列を改変した抗体を挙げることができる。

但し、B1抗体又はC1抗体由来のヒト化抗体としては、B1抗体又はC1抗体の6種全てのCDR配列を保持し、CLDN6結合活性を有する限り、特定のヒト化抗体に限定されず、更に1〜数個 (好ましくは、1〜2個、より好ましくは1個) のCDRのアミノ酸配列を改変したヒト化抗体変異体もCLDN6蛋白質を認識する又は該抗体のCLDN6蛋白質結合活性を有する限り、特定のヒト化抗体に限定されない。

本発明の抗CLDN6ヒト化抗体又はその機能性断片としては、例えば、

配列表の配列番号9 (図15) に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるCDRH1、

配列表の配列番号10 (図15) に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるCDRH2、及び、

配列表の配列番号11 (図15) に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるCDRH3を含む可変領域を有する重鎖、並びに、

配列表の配列番号5 (図13) に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるCDRL1、

配列表の配列番号6 (図13) に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からな

る CDRL2 、 及び 、

配列表の配列番号7 (図13) に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなる CDRL3 を含む可変領域を有する軽鎖を含み、

本発明の CLDN6 蛋白質を認識する又は該抗体の CLDN6 蛋白質結合活性を保持している抗体又は該抗体の機能性断片等を挙げることができる。

上記抗 CLDN6 ヒト化抗体又はその機能性断片における CDR のアミノ酸置換の例としては、好ましくは、上記 CDRL3 の1〜数個 (好ましくは、1〜2個) のアミノ酸置換が挙げられ、配列表の配列番号7のアミノ酸番号4番と5番のアミノ酸を置換した配列表の配列番号8 (図14) に示される CDRL3 を例示できる。

[01 34] 上記 CDRH を有するヒト化抗体の重鎖可変領域として、配列表の配列番号54 (図35) に示されるアミノ酸配列、配列表の配列番号58 (図37) に示されるアミノ酸配列、及び配列表の配列番号62 (図39) に示されるアミノ酸配列を例示でき、上記 CDRL を有するヒト化抗体の軽鎖可変領域として配列表の配列番号38 (図27) に示されるアミノ酸配列、配列表の配列番号42 (図29) に示されるアミノ酸配列、配列表の配列番号46 (図31) に示されるアミノ酸配列、及び配列表の配列番号50 (図33) に示されるアミノ酸配列を例示できる。

[01 35] 上記、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せを含むヒト化抗体として、配列表の配列番号54 (図35) に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列表の配列番号38 (図27) に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことからなるヒト化抗体、

配列表の配列番号58 (図37) に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列表の配列番号42 (図29) に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことからなるヒト化抗体、

配列表の配列番号54 (図35) に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列表の配列番号46 (図31) に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことからなるヒト化抗体、

配列表の配列番号58 (図37) に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域

域、および、配列表の配列番号50（図33）に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことからなるヒト化抗体、

配列表の配列番号62（図39）に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、および、配列表の配列番号46（図31）に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことからなるヒト化抗体を好適に例示できる。

[0136] 上記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せを含むことからなるヒト化抗体の全長配列として、

配列表の配列番号52（図34）のアミノ酸番号20～471に示されるアミノ酸配列からなる重鎖、及び、配列表の配列番号36（図26）のアミノ酸番号21～234に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むことからなるヒト化抗体（H1L1）

配列表の配列番号56（図36）のアミノ酸番号20～471に示されるアミノ酸配列からなる重鎖、及び、配列表の配列番号40（図28）のアミノ酸番号21～234に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むことからなるヒト化抗体（H2L2）

配列表の配列番号52（図34）のアミノ酸番号20～471に示されるアミノ酸配列からなる重鎖、及び、配列表の配列番号44（図30）のアミノ酸番号21～234に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むことからなるヒト化抗体（H1L3）

配列表の配列番号56（図36）のアミノ酸番号20～471に示されるアミノ酸配列からなる重鎖、及び、配列表の配列番号48（図32）のアミノ酸番号21～234に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むことからなるヒト化抗体（H2L4）

）、又は、

配列表の配列番号60（図38）のアミノ酸番号20～471に示されるアミノ酸配列からなる重鎖、及び、配列表の配列番号44（図30）のアミノ酸番号21～234に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含むことからなるヒト化抗体（H3L3）を例示できる。

なお、配列表の配列番号52（図34）、56（図36）、又は60（図38）に示さ

れる重鎖アミノ酸配列中で、1〜19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20〜141番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖可変領域であり、142〜471番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は重鎖定常領域である。

また、配列表の配列番号36（図26）、40（図28）、44（図30）又は48（図32）に示される軽鎖アミノ酸配列中で、1〜20番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21〜127番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖可変領域であり、128〜234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は軽鎖定常領域である。

[0137] 上記ヒト化抗体_{H1L1}の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号53（図34）、軽鎖アミノ配列をコードする塩基配列は配列番号37（図26）、ヒト化抗体_{H2L2}の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号57（図36）、軽鎖アミノ配列をコードする塩基配列は配列番号41（図28）、ヒト化抗体_{H1L3}の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号53（図34）、軽鎖アミノ配列をコードする塩基配列は配列番号45（図30）、ヒト化抗体_{H2L4}の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号57（図36）、軽鎖アミノ配列をコードする塩基配列は配列番号49（図32）、ヒト化抗体_{H3L3}の重鎖アミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号61（図38）、軽鎖アミノ配列をコードする塩基配列は配列番号45（図30）で示されるポリヌクレオチドである。

上記ヒト化抗体_{H1L1}の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号55（図35）、軽鎖可変領域のアミノ配列をコードする塩基配列は配列番号39（図27）、

ヒト化抗体_{H2L2}の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号59（図37）、軽鎖可変領域のアミノ配列をコードする塩基配列は配列番号43（図29）、

ヒト化抗体_{H1L3}の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号55（図35）、軽鎖可変領域のアミノ配列をコードする塩基配列は配列

番号 47 (図 31) 、

ヒト化抗体 H2L4 の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号 59 (図 37) 、軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号 51 (図 33) 、

ヒト化抗体 H3L3 の重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号 63 (図 39) 、軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号 47 (図 31) で示されるポリヌクレオチドである。

なお、配列表の配列番号 53 (図 34) 、57 (図 36) 、61 (図 38) に示される各ヌクレオチド配列の 1〜57 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は該ヒト化抗体重鎖のシグナル配列をコードしており、58〜423 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は該ヒト化抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードしており、424〜1413 番目の塩基配列のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は該抗体重鎖定常領域をコードしている。

また、配列表の配列番号 37 (図 26) 、41 (図 28) 、45 (図 30) 、49 (図 32) に示される各ヌクレオチド配列の 1〜60 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は該ヒト化抗体軽鎖のシグナル配列をコードしており、61〜381 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は該ヒト化抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードしており、382〜702 番目のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列は該抗体軽鎖定常領域をコードしている。

[0138] 上記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せを含むことからなる抗体、又は、上記重鎖及び軽鎖の組合せを含むことからなる抗体のアミノ酸配列との同一性又は相同性が 80% 以上、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、更に好ましくは 97% 以上、最も好ましくは 99% 以上である抗体も CLDN6 への結合活性を有する限り、本発明の抗体に含まれる。

また、上記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せを含むことからなる抗体、又は、上記重鎖及び軽鎖の組合せを含むことからなる抗体の CDR と同一のアミノ酸配列からなる CDR を有し、かつ該抗体の CDR のアミノ酸配列を除いたアミノ酸配列の同一性又は相同性が 80% 以上、好ましくは 90% 以上、より好

ましくは95%以上、更に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上である抗体もCLDN6への結合活性を有する限り、本発明の抗体に含まれる。

更に、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に1〜数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。また、本明細書中におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい (WO2013154206)。

保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaaf fer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman(1997), 「Gapped BLAST and PSI-BLAST :a new generation of prote in database search programsj ,Nuc leic Acids Res. 25 :3389 - 3402) のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Blast algorithm は、インターネットでwww.ncbi.nlm.nih.gov/b last にアクセスすることによっても使用することができる。

(3) ヒト抗体

本発明の抗体としては、さらに、CLDN6及び/又はCLDN9に結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗CLDN6及び/又はCLDN9ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗CLDN6ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法 (Nature Genetics(1997) 16, p. 133-143, ;Nuc l. Acids Res. (1998)26, p. 3447-3448; Animal Cell Technology :Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73, Kluwer Academic Publishers, 1999. ;Proc. Nat l. Acad. Sci. USA(2000) 97, p. 722-727 等を参照。) によって取得することができる。

このようなヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物として、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製及びこれらの動物同士を掛け合わせることで、によって作り出すことができる。

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

ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Investigative Ophthalmology & Visual Science, (2002)43(7), p. 2301-2308; Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002), 1(2), p. 189-203; Ophthalmology(2002) 109(3), p. 427-431 等参照。) も知られている。

例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (Nature Biotechnology(2005), 23, (9), p. 1105-1116) を用いることができる。

抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによってヒト抗体を取得することができる (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, p. 433-455, Nature Biotechnology(2005)23(9), p. 1105-1116)。

[0139] 以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体等は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査熱量計（DSC）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（ T_m ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。DSCを用いて T_m 値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており

(Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p. 206-273)、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0140] 本発明の抗体は、本発明の提供する抗CLDN6抗体と「同一の部位に結合する抗体」も含む。すなわち、本発明のB1又はC7が認識するCLDN6蛋白質上の部位に結合する抗体も本発明に含まれる。

[0141] 本発明の抗体には抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗体に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N-結合又はO-結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、N-結合又はO-結合型糖鎖付加、N末又はC末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによってN末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識

体もかかる修飾体の意味に含まれる。このような本発明の抗体の修飾体は、抗体の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、W01 999/54342、WO2000/61 739、WO2002/31 140等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

かかる修飾には、抗体又はその機能性断片における任意の位置に、または所望の位置においても施されてもよく、1つ又は2つ以上の位置に同一又は2種以上の異なる修飾がなされていてもよい。

本発明において「抗体断片の修飾体」は「抗体の修飾体の断片」をもその意味に含むものである。

[0142] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列等をコードする遺伝子、及び軽鎖配列等をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子等と軽鎖配列遺伝子等は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Ce は (1981)23, p. 175-182、ATCC CRL-1 650）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC No. CRL-1 658）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC CCL-61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980)77, p. 4126-4220）、FreeStyle 293F細胞（Invitrogen社）を挙げることもできる。

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることもでき

る。

これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換によって導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによって抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体の製造方法によって得られる抗体も含まれる。

[0143] 上記抗体遺伝子は、好ましくは、以下の (a) ～ (e) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドである。

(a) B1もしくはC7抗体、chB1抗体、及び、ヒト化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、H3L3のいずれか一つの抗体の重鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと軽鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ、

(b) B1もしくはC7抗体、chB1抗体、及び、ヒト化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、H3L3のいずれか一つの抗体のCDRH1～CDRH3を含む重鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドとCDRL1～CDRL3を含む軽鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ

(c) B1もしくはC7抗体、chB1抗体、及び、ヒト化抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、H3L3のいずれか一つの抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ

(d) (a) ～ (c) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなるヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、且つ、CDLN6に結合する抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、及び、

(e) (a) ～ (c) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドにおいて1～50個、1～45個、1～40個、1～35個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、1

〜10個、1〜8個、1〜6個、1〜5個、1〜4個、1〜3個、1若しくは2個、または1個のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入してなるポリペプチドのアミノ酸配列をコードし、且つ、CLDN6に結合する抗体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

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

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

[0144] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Journal of Chromatography A, 705:129-134(1995)）、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Analytical Biochemistry, 360:75-83(2007)）。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用等）には影響を及ぼさない。従って、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端の1つのアミノ酸残

基が欠失している場合を挙げることができる。

[0145] 本発明の抗CLDN6抗体のアイソタイプとしては、例えばIgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)等を挙げることができるが、好ましくはIgG1、IgG2又はIgG4を挙げることができる。

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

[0146] 抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性、補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性及び抗体依存性細胞媒介食作用 (ADCP) を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、CLDN6に対する結合活性であり、好ましくはCLDN6と結合することによってCLDN6発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ADCC活性、CDC活性及び/又はADCP活性を併せ持ってもよい。

[0147] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999

6) Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))が、これらに限定されるものではない。

クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げるができる。

また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0148] 本発明の抗HER2抗体は、特に制限はないが、例えば、以下の特性を有するものが望ましい。

(1) 以下の特性を有することを特徴とする抗HER2抗体；

(a) HER2に特異的に結合する。

(b) HER2と結合することによってHER2発現細胞に内在化する活性を有する。

。

(2) HER2の細胞外ドメインに結合する上記(1)に記載の抗体。

(3) 前記抗体がモノクローナル抗体である上記(1)又は(2)に記載の抗体。

。

(4) 抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有する上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体である、上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(6) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、ADCC及び／又はCDC活性の低減をもたらす変異を含む、上記(1)～(3)のいずれかに記載の抗体。

。

(7) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EU Indexにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(6)に記載の抗体。

(8) 配列番号65に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(1)～(4)のいずれかに記載の抗体。

(9) 配列番号75のアミノ酸番号20～469に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号73のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(1)～(3)、(6)又は(7)のいずれかに記載の抗体。

(10) 重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失している上記(1)～(9)のいずれかに記載の抗体。

(11) 配列番号65のアミノ酸番号1～449に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号64のアミノ酸番号1～214に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる上記(1)～(3)、(8)又は(10)のいずれかに記載の抗体。

(12) 配列番号75のアミノ酸番号20～468に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号73のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなる上記(1)～(3)、(6)、(7)、(9)又は(10)のいずれかに記載の抗体。

(13) 上記(1)～(12)のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養する工程及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含む当該抗体の製造方法によって得られる抗体。

[0149] <糖鎖リモデリング>

近年、不均一な抗体の糖タンパク質を、酵素反応等によってリモデリングし、官能基を有する糖鎖を均一に導入する方法が報告されている (ACS Chemical Biology 2012, 7, 110、ACS Medicinal Chemistry Letters 20

16, 7, 1005) 。この糖鎖リモデリング技術を用いて、部位特異的に薬物を導入し、均一なADCを合成する試みもなされている (Bioconjugate Chemistry 2015, 26, 2233、Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367、US2016361436) 。

[0150] 本発明の糖鎖のリモデリングはまず加水分解酵素を利用して、蛋白質 (抗体等) に付加されている不均一な糖鎖を末端のGLcNAcのみ残して切除し、GLcNAcが付加した均一な蛋白質部分を調製する (以下、「アクセプター」と言う) 。次に、別途調製した任意の糖鎖を用意し (以下、「ドナー」と言う) 、このアクセプターとドナーを糖転移酵素を用いて連結する。これにより、任意の糖鎖構造を持った均一な糖蛋白質を合成できる。

[0151] 本発明において、「糖鎖」とは、2つ以上の単糖がグリコシド結合により結合された構造単位を意味する。具体的な単糖や糖鎖を、例えば"GLcNAc—"、"MSG—"のように、略号として標記することがある。構造式中でこれらの略号で記載した場合、還元末端で別の構造単位とのグリコシド結合に帰属する酸素原子又は窒素原子は、特別な定義がある場合を除き、当該糖鎖を表す略号には含まれないものとして表示される。

[0152] 本発明において、糖鎖の基本単位となる単糖の記載は、別に定める場合を除き、便宜上、その環構造において、環を構成する酸素原子に結合し、且つ、水酸基 (又はグリコシド結合に帰属する酸素原子) と直接結合した炭素原子を1位 (シアル酸においてのみ2位) として表記する。実施例化合物の名称は、化学構造全体として付されたものであり、このルールは必ずしも適用されない。

[0153] 本発明において、糖鎖を記号 (例えば、GLY、SG、MSG、GLcNAc等) として記載する場合、別に定義される場合を除き、還元末端の炭素までを、当該記号に含めるものとし、N—又はO—グリコシド結合に帰属するN又はOは、当該記号には含まれないものとする。

[0154] 本発明において、特別な記載がない限り、アミノ酸の側鎖において糖鎖と連結した場合の部分構造は、側鎖部分を括弧で表示し、例えば、「(SG—)A

sn」のように表記するものとする。

[01 55] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、次式

[化 82]



で示され、抗体Ab又はその機能性断片は、そのアミノ酸残基（例えば、システイン、リジン等）の側鎖から直接Lに結合するか、Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からLに結合していてもよく、好ましくは、Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からLに結合しており、より好ましくは、Abのリモデリングされた糖鎖からLに結合している。

[01 56] 本発明におけるAbの糖鎖は、N結合型糖鎖やO結合型糖鎖であり、好ましくは、N結合型糖鎖である。

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

[01 57] 本発明のAbは、IgGであり、好ましくは、IgG1、IgG2又はIgG4である。

[01 58] IgGはその重鎖のFc領域における297番目のアスパラギン残基（以下、「Asn 297又はN297」という。）によく保存されたN結合型糖鎖を有しており、抗体分子の活性や動態等に寄与することが知られている（Biotechnol. Prog., 2012, 28, 608-622、Sanglier-Cianferani, S., Anal. Chem., 2013, 85, 715-736）。

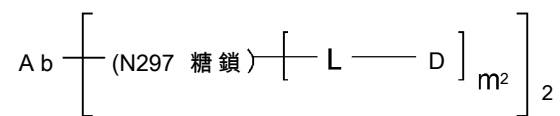
[01 59] IgGの定常領域におけるアミノ酸配列はよく保存されており、Edelman et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 63, No. 1 (May 15, 1969), pp. 78-85)において、それぞれのアミノ酸がEu番号（Eu INDEX）で特定されている。例えば、Fc領域においてN結合型糖鎖が付加するAsn297は、Eu番号において297位に相当するものであり、分子の断片化や領域欠損によって実際のアミノ酸位置が変動した場合であってもEu番号で表示することによってアミノ酸が一義的に特定される。

[01 60] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、より好ましくは、抗体又は

その機能性断片はそのAsn297の側鎖に結合する糖鎖（以下、「N297糖鎖」という）からLに結合しており、更に好ましくは、抗体又はその機能性断片は前記N297糖鎖からLに結合しており、当該N297糖鎖がリモデリングされた糖鎖である。

下式は本発明の抗体-薬物コンjugateが抗体又はその機能性断片の前記N297糖鎖からLに結合している場合を示す。

[化83]



なお、当該リモデリングされた糖鎖を有する抗体を糖鎖リモデリング抗体という。

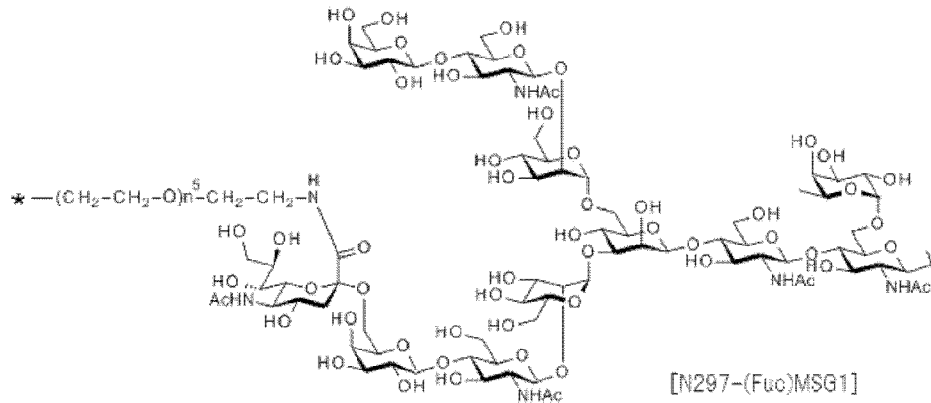
[0161] SGPはSialyl GlycoPeptideの略であり、N結合型複合糖鎖の代表的なものである。鶏卵の卵黄から、SGPは、例えば、WO2011/027868に記載の方法に従って単離、精製することができる。また、SGPの精製品が市販（東京化成（株）、（株）伏見製薬所）されており、購入することができる。SGの糖鎖部分において還元末端のGlcNAcが一つ欠損した糖鎖（以下、「SG（10）」）のみからなるジシアロオクタサッカリド（東京化成（株））などが市販されている。

[0162] 本発明において、SG（10）の β -Manの分岐鎖のいずれか一方のみで非還元末端のシアル酸が欠失した糖鎖構造をMSG（9）といい、分岐鎖の1-3糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG1、分岐鎖の1-6糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG2、とそれぞれ表記するものとする。

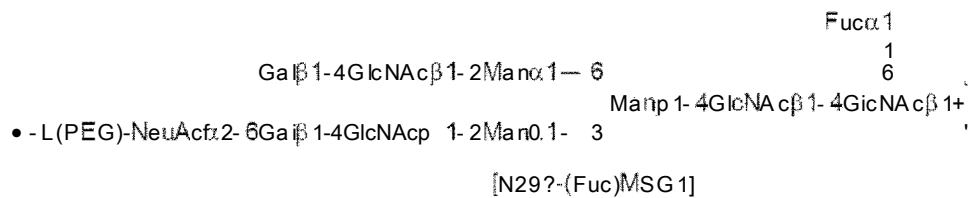
[0163] 本発明のリモデリングされた糖鎖は、N297-（Fuc）MSG1、N297-（Fuc）MSG2もしくはN297-（Fuc）MSG1とN297-（Fuc）MSG2の混合物、又はN297-（Fuc）SGであり、好ましくは、N297-（Fuc）MSG1、N297-（Fuc）MSG2又はN297-（Fuc）SGであり、より好ましくはN297-（Fuc）MSG1、N297-（Fuc）MSG2である。

[0164] N297-（Fuc）MSG1は以下の構造式又は配列式で示される。

[化 84]



[化 85]



上記式中、波線は抗体のAsn297 に結合していることを示し、

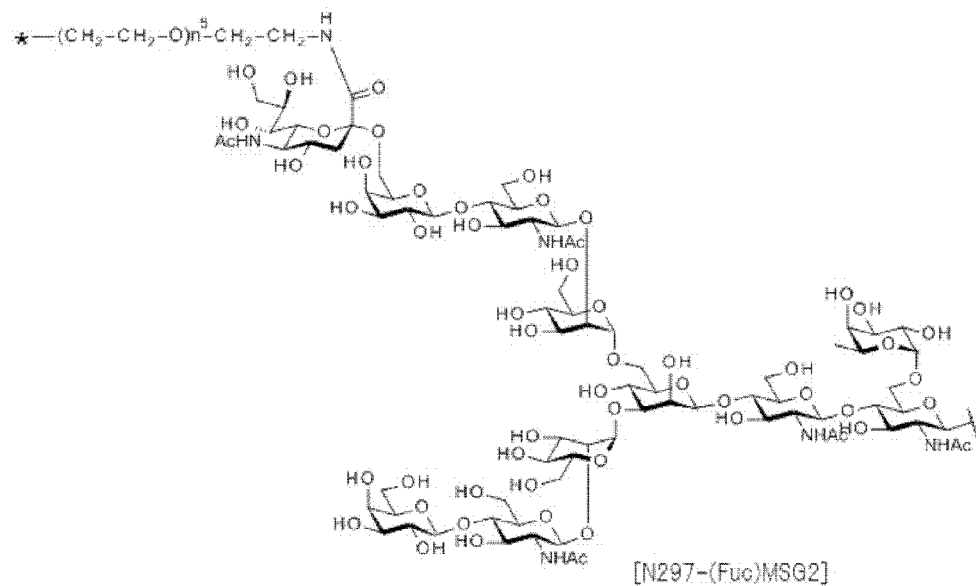
L (PEG) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、右端のアミノ基がN297糖鎖の β —Manの分岐鎖の1_3鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー—特にリンカーLにおけるLbの1, 2, 3—トリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

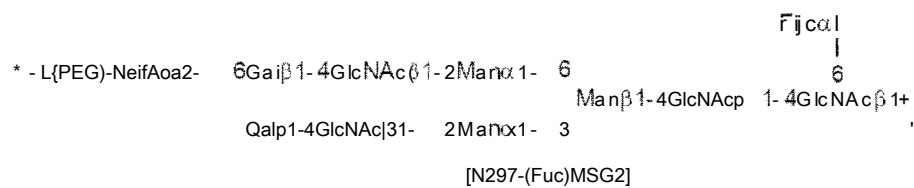
ここで、 n^5 は2～10の整数であり、好ましくは、2～5の整数である。

[0165] N297- (Fuc) MSG2は以下の構造式又は配列式で示される。

[化 86]



[化 87]



上記式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

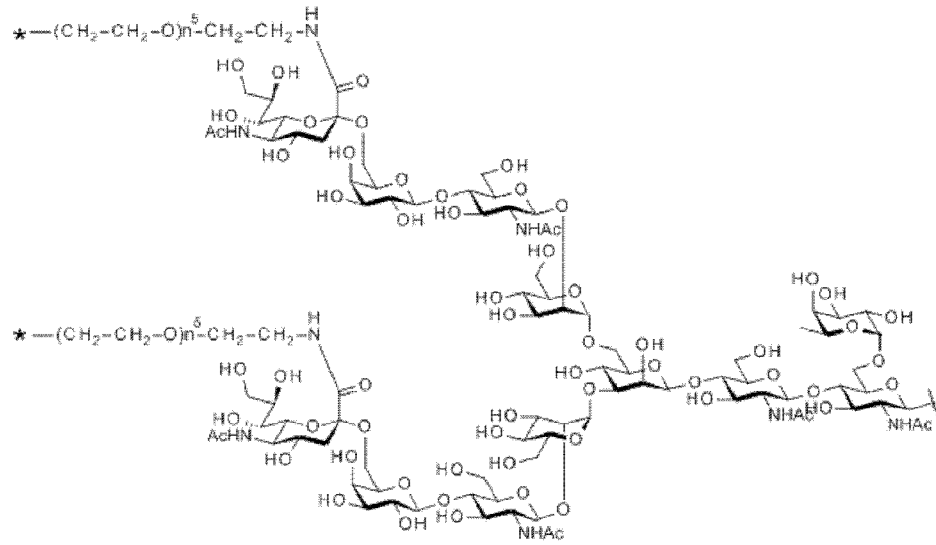
L (PEG) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、右端のアミノ基が N297 糖鎖の β —Man の分岐鎖の 1_6 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーシ 特 にリンカーLにおけるLbの1, 2, 3—トリ
アゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

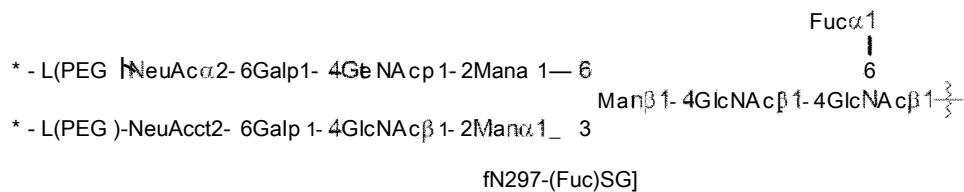
ここで、 n^5 は2～10の整数であり、好ましくは、2～5の整数である。

[0166] N297- (Fuc) SGは以下の構造式又は配列式で示される。

[化 88]



[化 89]



上記式中、波線は抗体のAsn297 に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(CH_2CH_2-O)_n-CH_2CH_2-NH-$ を示し、右端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、アステリスクは、前記 リンカーし 特に リンカー-L における Lb の 1, 2, 3_ トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、

ここで、 n^5 は2～10の整数であり、好ましくは、2～5の整数である。

[0167] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖が、N297-(Fuc)MSG1もしくはN297-(Fuc)MSG2又はそれらの混合物である場合、抗体は二量体であるため、抗体—薬物コンジュゲートは2つのリンカーL及び2つの薬物Dが結合された分子(上記 $m^2=1$)となる(図1参照)。

例えば、実施例 74 :ADC8 は N297 糖鎖が N297- (Fuc) MSG1 の場合であり、実施例 67 :ADC1 は、N297 糖鎖が N297- (Fuc) MSG1 及び N297- (Fuc) MSG2 の混合物の場合

合である。

[0168] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖が、N297-(Fuc)SGである場合、抗体は二量体であるため、抗体—薬物コンジュゲートは4つのリンカーL及び4つの薬物Dが結合された分子(上記 $m^2=2$)となる。例えば、実施例72:ADC6はN297糖鎖がN297-(Fuc)SGの場合である。

[0169] N297糖鎖は、好ましくは、N297-(Fuc)MSG1もしくはN297-(Fuc)MSG2又はN297-(Fuc)SGであり、より好ましくは、N297-(Fuc)MSG1もしくはN297-(Fuc)MSG2である。

本発明の抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖がN297-(Fuc)MSG1もしくはN297-(Fuc)MSG2又はN297-(Fuc)SGである場合、均一なADCを取得することができる。

[0170] 本発明は、以下i)〜iii)の工程を含むリモデリング抗体又は該抗体の機能性断片の製造方法を提供する。

i) 前記[46]〜[48]のいずれか一つに記載の宿主細胞(例えば、動物細胞(CHO細胞等))を培養し、得られた培養物から目的の抗体を採取する工程、

ii) 工程i)で得られた抗体を加水分解酵素で処理し、N297糖鎖が(Fuc α 1,6)GlcNAcである抗体((Fuc α 1,6)GlcNAc—抗体)を製造する工程(図3A)、

好ましくは、更に当該反応液を、ハイドロキシアパタイトカラムによる精製を含む工程により(Fuc α 1,6)GlcNAc—抗体を精製する工程を含む、及び

iii) i)又はii)のいずれか一つの工程(図3B)。

iii)-1 MSG(9)又はSG(10)のシアル酸の2位のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有するPEGリンカー(N_3 -L(PEG))を導入し、還元末端をオキサゾリン化した糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で(Fuc α 1,6)GlcNAc—抗体を反応させ、シアル酸にアジド基が導入された糖鎖リモデリング抗体を合成する工程、

に、 α -アミノ基が保護あるいは修飾されていてもよい (MSG-) Asn 又は (SG-) Asn のシアル酸の2位のカルボン酸のカルボニル基及び前記 Asn のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有する PEG リンカー (N₃-L (PEG)) を導入し、加水分解酵素を作用させた後、還元末端をオキサゾリン化した糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で (Fuc α 1, 6) GlcNAc-抗体を反応させ、シアル酸にアジド基が導入された糖鎖リモデリング抗体を合成する工程。

また、かかる製造方法により得られた糖鎖リモデリング抗体もしくはその機能性断片、又はそれらの修飾体も本発明に含まれる。

[0171] 前記本抗体-薬物コンjugateの製造中間体は DBCO (Dibenzocyclooctyne) 等のアジド基と反応するアルキン構造を有する。従って、当該製造中間体を前記 i) ~ 1) の工程で得られる糖鎖のシアル酸にアジド基を有する PEG リンカーが導入された MSG1 型、MSG2 型又は SG 型糖鎖リモデリング抗体又は該抗体の機能性断片と反応させることで、本発明の抗体-薬物コンjugateを製造することができる。

[0172] 本発明の N297 糖鎖において、還元末端のフコース付加した GlcNAc (Fuc α 1, 6) GlcNAc は、動物細胞で産生された抗体に由来し、それより非還元末端側の糖鎖は、上述した MSG (MSG1、MSG2) 又は SG と同様の糖鎖構造にリモデリングされたものが好ましい。いずれもその非還元末端のシアル酸2位に結合したカルボン酸を利用して、L (PEG) と結合している。

このような MSG (MSG1、MSG2) 又は SG 型 N297 糖鎖を有する糖鎖リモデリング抗体は、例えば WO2013/120066 などに記載の方法に準じて、図3に示すような方法で製造することができる。公知の方法に準じて宿主として動物細胞を用いて、遺伝子組み換え蛋白質として抗体を産生させた場合 (上記工程 i)、N297 糖鎖は、基本構造としてフコース付加した N 結合型糖鎖構造を有するが、非還元末端の構造や構成糖に多様な修飾がされた様々な構造からなる糖鎖を有する抗体またはその断片の混合物として得られる (図3Aの IV)。このように動物細胞で産生された抗体は、EndoS などの加水分解酵素で処理することによ

つて、還元末端のキトピオース構造の $\text{GlcNAc}\beta 1\text{--}4\text{GlcNAc}$ の間のグリコシド結合が加水分解され、N297糖鎖として $(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc}$ のみを有する単一の糖鎖構造を有する抗体分子（「 $(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc}$ —抗体」という、図2のA参照）が得られる（図3A）（上記工程 i））。

[01 73] N297糖鎖の加水分解反応に用いる酵素としては、EndoS又はその加水分解活性を保持した変異酵素などを用いることができる。

[01 74] 上記の加水分解反応により得られた $(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc}$ —抗体を糖鎖アクセプター分子として、EndoS D233Q又はEndoS D233Q/Q303L 変異体のような糖転移酵素（WO2017010559等）を用いてMSG（MSG1、MSG2）又はSG型糖鎖ドナー分子と反応させることによって、上述の構造からなるMSG（MSG1、MSG2）又はSG型N297糖鎖を有する抗体（図2のB参照）を得ることができる（図3B）（上記工程 iii）—1、ii）-2）。

[01 75] 抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数 n^2 が1の場合、糖鎖としてMSG、MSG1又はMSG2を有する糖鎖ドナー分子を採用する。このような糖鎖は、市販のmonosialo-Asn free（1S2G/1G2S-10NC-Asn、（株）糖鎖工学研究所、以下、「 $(\text{MSG—})\text{Asn}_j$ 」と言う）を原料に実施例56に記載の方法に準じて $(\text{MSG—})\text{Asn}_1$ 又は $(\text{MSG2—})\text{Asn}$ を分離して採用することもできるし、分離せずに混合物として採用することもできる。

[01 76] 抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数 n^2 が2の場合、この糖転移反応には糖鎖としてSG（10）を有する糖鎖ドナー分子を用いる。このようなSG（10）糖鎖は、例えばSGPから加水分解等によって取得されたものを用いても良く、市販のジシアロオクタサッカリド（東京化成工業（株））のようなSG（10）糖鎖を用いてもよい。

[01 77] ドナー分子に含まれるMSG（MSG1、MSG2）又はSG型糖鎖はそのシアル酸の2位にアジド基を含むPEGリンカー（ $\text{N}_3\text{—L(PEG)}$ ）を有する。シアル酸の2位へのアジド基を含むPEGリンカー（ $\text{N}_3\text{—L(PEG)}$ ）の導入には、MSG（MSG（9））、MSG1もしくはMSG2又はジシアロオクタサッカリド（SG（10））とアジド基を含むPEGリンカー（ $\text{N}_3\text{—L(PEG)}$ ）である $\text{N}_3\text{—(CH}_2\text{CH}_2\text{—O)}_{n_5}\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—NH}_2$ （ n_5 は2

〜10の整数であり、好ましくは、2〜5の整数を示す。)を有機合成科学分野で公知の反応(縮合反応等)を利用することができる。すなわち、シアル酸2位へのカルボン酸と $N_3-(CH_2CH_2-O)_{n_5}-CH_2CH_2-NH_2$ の右末端のアミノ基が縮合反応によりアミド結合を形成する。

[0178] また、MSG (MSG 1、MSG2) 又はSG型糖鎖は、例えば α -アミノ基が保護あるいは修飾されていてもよい (MSG1-) Asn、(MSG2-) Asn 又は (SG-) Asn (糖鎖工学研究所)等の原料のシアル酸の2位のカルボン酸及び前記Asnのカルボン酸に縮合反応を利用してアジド基を有するPEGリンカー ($N_3-(CH_2CH_2-O)_{n_5}-CH_2CH_2-NH_2$) を導入し、EndoM や EndoRp のような加水分解酵素を作用させて得ることもできる(上記に於いて、2)。 α -アミノ基の保護基としてはアセチル (Ac) 基、t-Bu t oxyca r bony l (Boc) 基、ベンゾイル (Bz) 基、ベンジル (Bz L) 基、Carbobenzoxyl (Cbz) 基、9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 基等が挙げられるが、これに限らない。 α -アミノ基の保護基は、好ましくは、Fmoc 基である。

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

(MSG 1-) Asn、(MSG- 2) Asn 又は (SG-) Asn は、好ましくは、 α -アミノ基が前記保護基で保護されている。 α -アミノ基が保護基(例えば、Fmoc 基)で保護されている場合、必要に応じ、アジド基を有するPEGリンカーを導入した後、加水分解酵素を作用させる前に保護基を除去することができる。

[0179] 分子に含まれるMSG (MSG 1、MSG2) 又はSG型糖鎖の還元末端のGlcNAcは、例えば2-クロロ-1,3-ジメチル-1H-ベンズイミダゾール-3-イウム-クロライド処理によるオキサゾリン化のような形で活性化されたものを用いることが好ましい。

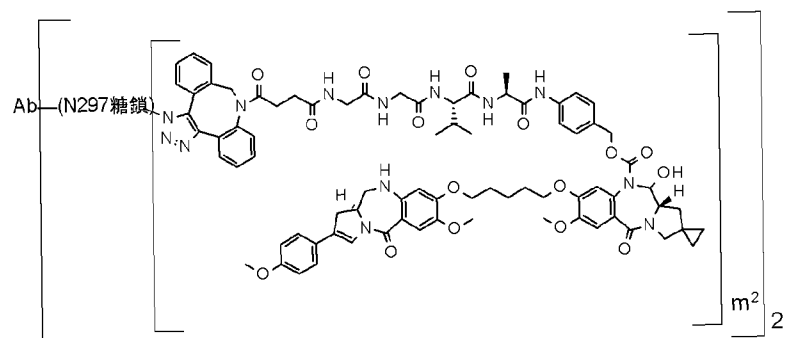
[0180] 糖転移反応に用いる酵素(糖転移酵素)としては、N297糖鎖に複合型糖鎖を転移させる活性を有するものであれば様々なものが採用できるが、好ましいものはEndoSの233番目のAspをGlnに置換することで加水分解反応を抑制した改変体であるEndoS D233Qである。EndoS D233Qを用いた糖転移反応につ

いては、WO2013/120066などに記載されている。また、EndoS D233Q に対して、さらに変異を加えた EndoS D233Q/Q303L のような改変体酵素 (WO2017010559) を利用してもよい。

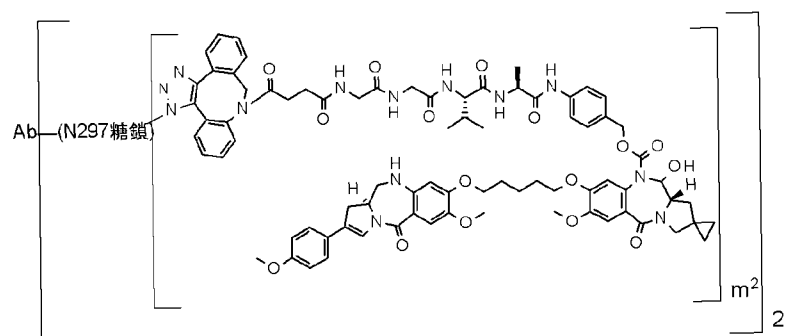
[0181] 抗体の糖鎖リモデリング (糖加水分解、及び糖鎖転移反応) 後の抗体の精製操作は、反応に使用した低分子化合物及び酵素との分離を目的とし、このような精製には、通常、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどが使用されるが、更にヒドロキシアパタイトカラムによる追加精製を行ってもよい。すなわち、本発明は、抗体の糖加水分解後の反応液からの中間体の精製工程において、更にヒドロキシアパタイトカラムによる精製工程を含む、薬物—コンジュゲート体の製造方法を提供する。糖鎖リモデリング報告例 (J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308-12318.; Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367) に従うと、抗体を加水分解酵素で処理した反応液をプロテインAカラム (アフィニティークロマトグラフィーカラム) で精製するのみであるが、この精製方法では、加水分解酵素 (EndoS等) が完全には除去できず、残留酵素が影響して、次の糖転移反応に影響を与えることが判明した。ここで、精製法を検討した結果、抗体を加水分解酵素で処理した反応液をプロテインAカラム、ヒドロキシアパタイトカラム (CHTカラム、Bio-Rad Laboratories, Inc.) の順に精製することによって、残留酵素の影響なく、次の糖鎖転移反応の反応効率が向上した。

[0182] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートは、最も好ましくは、次の群から選ばれる1の抗体—薬物コンジュゲートである。

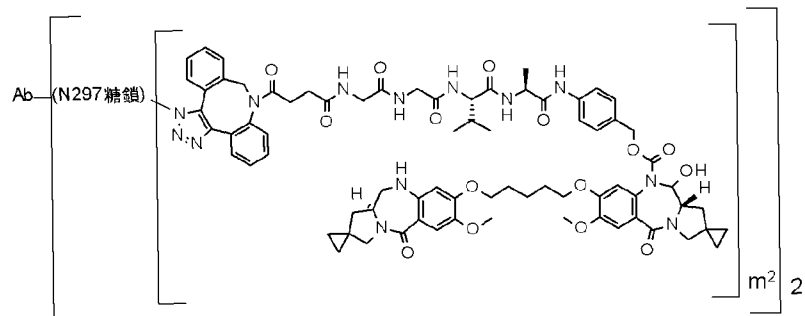
[化 90]



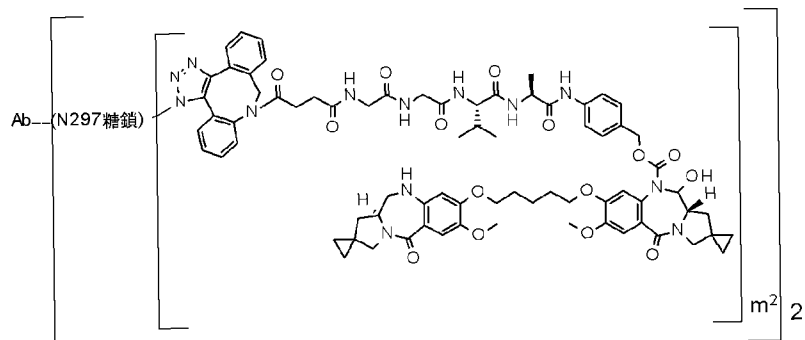
もしくは



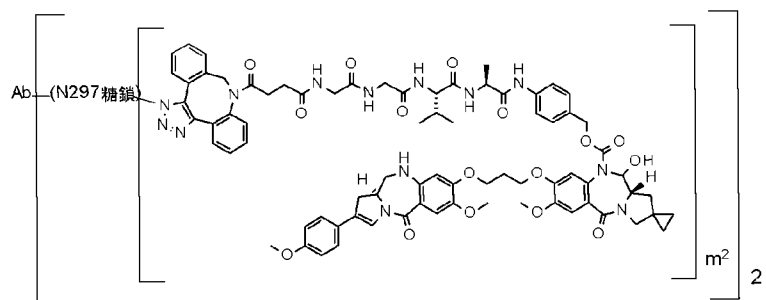
[化 9 1]



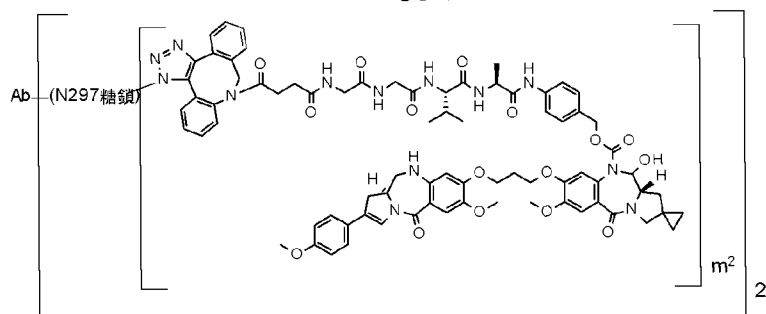
もしくは



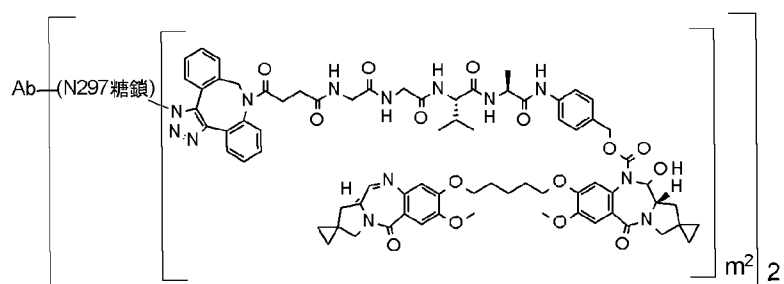
[化 92]



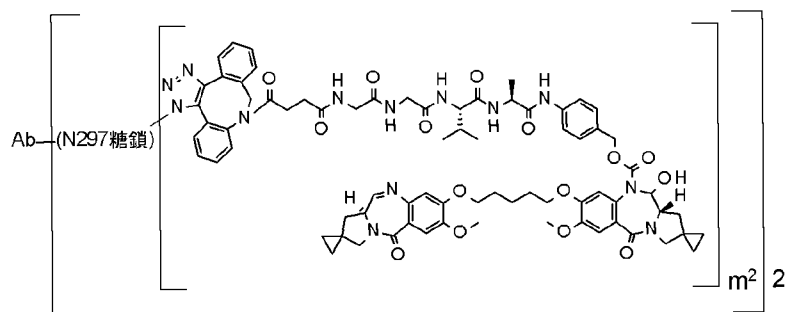
もしくは



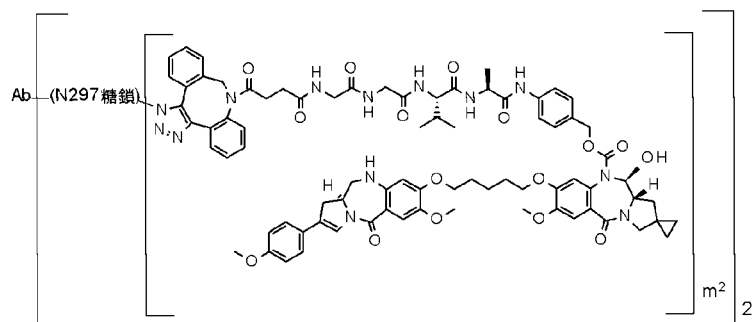
[化 93]



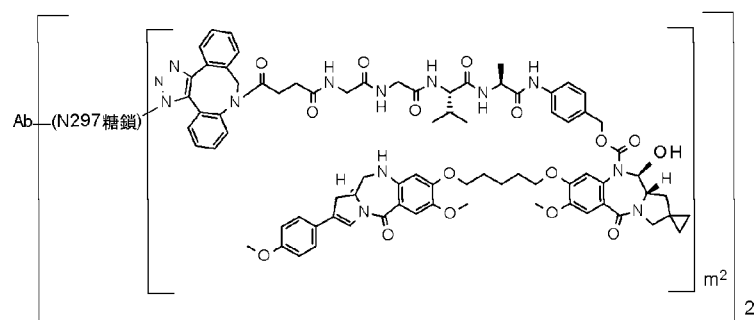
もしくは



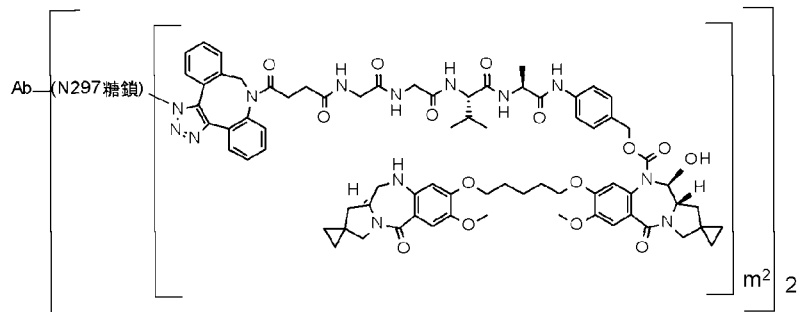
[化 94]



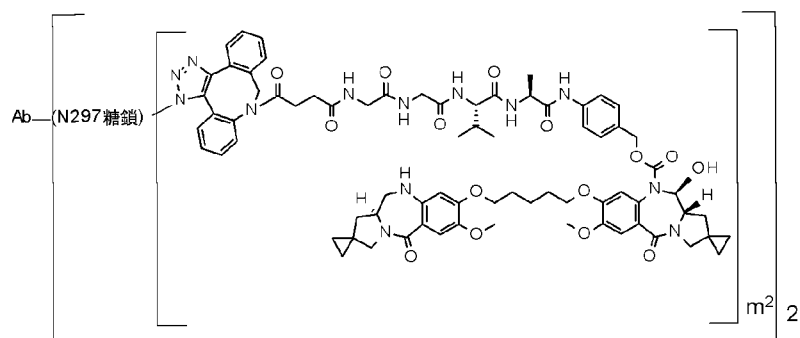
もしくは



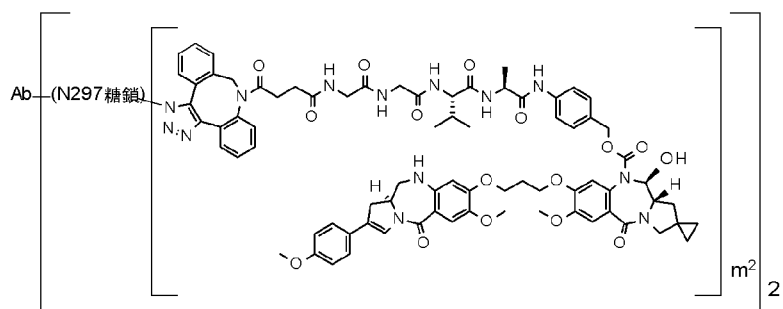
[化 95]



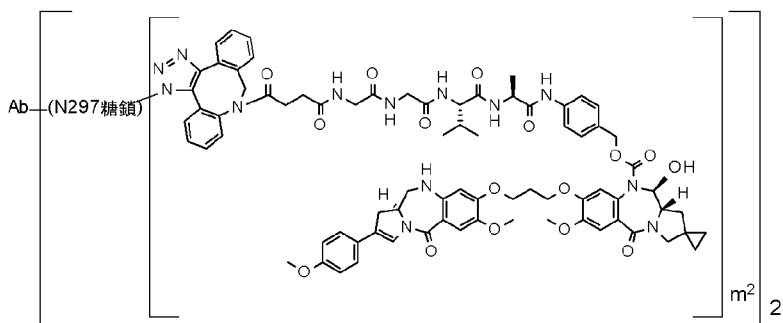
もしくは



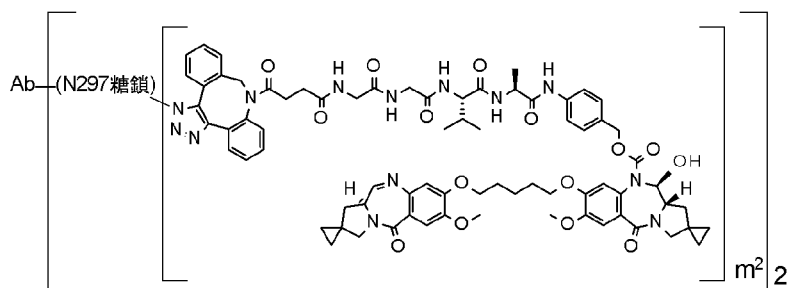
[化 96]



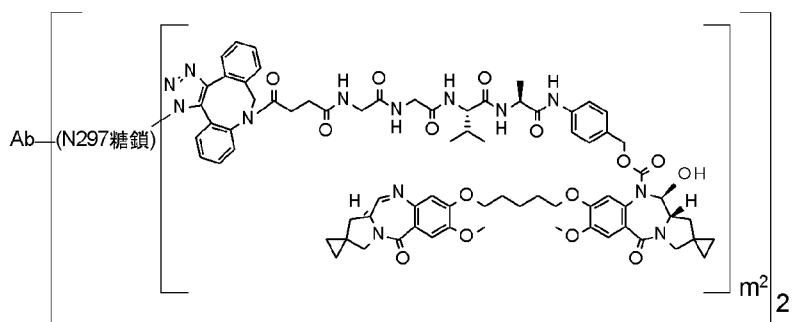
もしくは



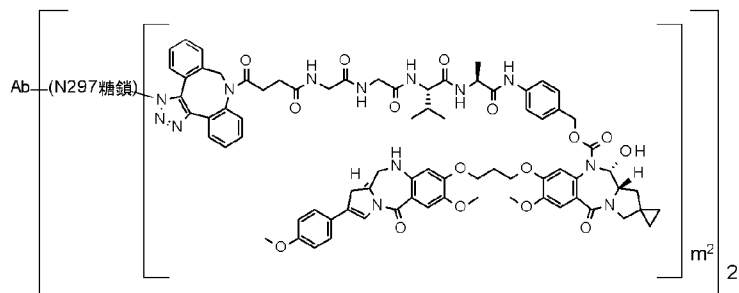
[化 97]



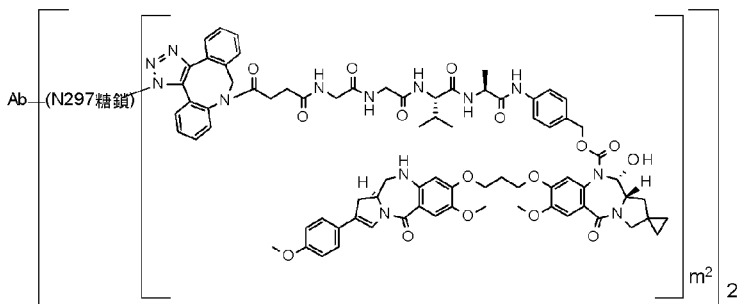
もしくは



[化 100]

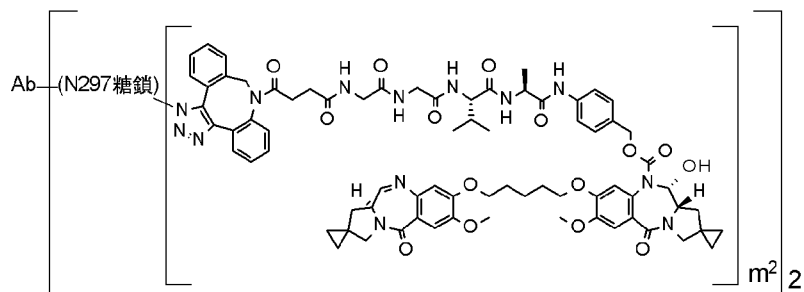


もしくは

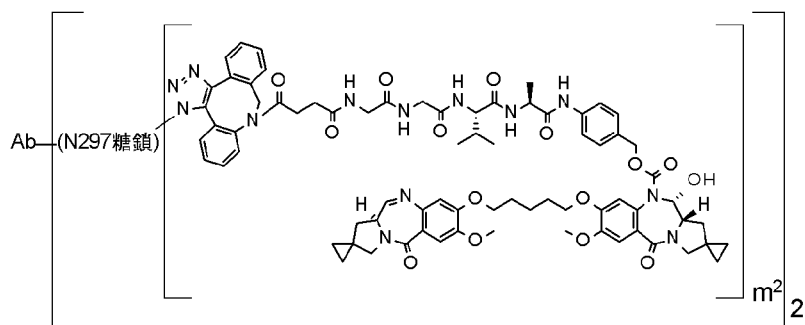


、又は、

[化 101]



もしくは



上記で示されるそれぞれの構造式において、 m^2 は1又は2（好ましくは、 m^2 は1）であることを示し、

抗体AbはIgG抗体（好ましくは、IgG1、IgG2、IgG4、より好ましくは、IgG1

) 又はその機能性断片であり、

N297 糖鎖は、N297- (Fuc) MSG 1、N297- (Fuc) MSG2 もしくはそれらの混合物又は N297- (Fuc) SG (好ましくは、N297- (Fuc) MSG 1) のいずれか一つであることを示し、

L (PEG) は、 $-NH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_3-^*$ であることを示し、左端のアミノ基が N297 糖鎖の β -Man の分岐鎖の 1-3 鎖側又は / 及び 1-6 鎖側 (好ましくは、1-3 鎖側) の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、アステリスクは、前記リンカー L における Lb の トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示す。

便宜上、上記最も好ましい抗体-薬物コンjugate として、コンjugate 体 1 分子中に「N297 糖鎖が L 中の Lb の トリアゾール環上の 1 位の窒素原子と結合した『(N297 糖鎖)-L-D』(『(N297 糖鎖)-(N1Lb) L-D』) を 2 又は 4 個 ($m^2 = 1$ 又は 2) 有するか、3 位の窒素原子と結合した『(N297 糖鎖)-L-D』(『(N297 糖鎖)-(N3Lb) L-D』) を 2 又は 4 個 ($m^2 = 1$ 又は 2) 有する構造を記載しているが、コンjugate 体 1 分子中に『(N297 糖鎖)-(N1Lb) L-Dj』($m^2 = 1$ の場合、1 個、 $m^2 = 2$ の場合、1, 2, 3 個) 及び『(N297 糖鎖)-(N3Lb) L-D』($m^2 = 1$ の場合、1 個、 $m^2 = 2$ の場合、3, 2, 1 個) の両方を有する抗体-薬物コンjugate も含む。すなわち、コンjugate 体 1 分子中に『(N297 糖鎖)-(N1Lb) L-D』か『(N297 糖鎖)-(N3Lb) L-D』のいずれか一方のみ、又は、その両方が混在している。

[0183] 更に、Ab は、好ましくは、抗 CLDN6 抗体、抗 CLDN6/CLDN9 抗体、抗 HER2 抗体、抗 DLL3 抗体、抗 FAP 抗体、抗 CDH 11 抗体、抗 A33 抗体、抗 CanAg 抗体、抗 CD 19 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD56 抗体、抗 CD70 抗体、抗 CD98 抗体、抗 TR0P2 抗体、抗 CEA 抗体、抗 Crypto 抗体、抗 EphA2 抗体、抗 FGFR2 抗体、抗 G250 抗体、抗 MUC 1 抗体、抗 GPNMB 抗体、抗 Integrin 抗体、抗体 PSMA 抗体、抗 Tenascin-C 抗体、抗 SLC44A4 抗体、抗 Mesothelin 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 DR5 抗体であり、より好ましくは、抗 CLDN6 抗体、抗 CLDN6/CLDN9 抗体、抗 HER2 抗体、抗 CD98 抗体、抗 TR0P2 抗体であり、さらに好ましくは

前記抗 CLDN6 抗体（例えば、実施例 106、107、108、109）、抗 HER2 抗体（例えば、Trastuzumab、Trastuzumab 変異体）である。

[01 84] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート及び本発明の抗 CLDN6 抗体もしくは抗 HER2 抗体－薬物コンジュゲートは、強い腫瘍活性（in Vivo 抗腫瘍活性、in vitro 抗細胞活性）、良好な体内動態及び物性を示し、かつ安全性が高いため、医薬品として有用である。

[01 85] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート、その遊離薬物もしくはその製造中間体には、立体異性体あるいは不斉炭素原子に由来する光学異性体、幾何異性体、互変異性体又は d 体、l 体、アトロブ異性体等の光学異性体が存在することもあるが、これらの異性体、光学異性体及びこれらの混合物のいずれも本発明に含まれる。本発明の PBD 誘導体 (V) 又は (VI) は 11' 位に不斉炭素が存在するため、光学異性体が存在する。本明細書において、これらの異性体、およびこれらの異性体の混合物がすべて単一の式、すなわち一般式 (V) 又は (VI) で表されている。従って、(V) 又は (VI) は光学異性体及び光学異性体の任意の割合での混合物をもすべて含むものである。(V) 又は (VI) の 11' 位の絶対立体配置は結晶性の生成物又は中間体もしくはそれらの誘導体の X 線結晶構造解析や Mosher 法等の NMR により決定することができる。その際、立体配置が既知である不斉中心を持つ試薬で誘導化された結晶性の生成物又は中間体を用いて絶対立体配置を決定してもよい。立体異性体は、合成した本発明に係る化合物を所望により通常の光学分割法又は分離法を用いて分離することにより得ることができる。

[01 86] 本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗体 1 分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体－薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体 1 分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数 (DAR : Drug to Antibody Ratio) として特定することができる。抗体分子へのピロ

ロベンゾジアゼピン誘導体の結合数はコントロール可能であり、1抗体あたりの薬物平均結合数 (DAR) として、1から10の範囲のピロロベンゾジアゼピン誘導体を結合させることができるが、好ましくは1から8個であり、より好ましくは1から5個である。

本発明の抗体—薬物コンジュゲートにおいて、抗体が、抗体のリモデリングされた糖鎖からLに結合している場合、抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数 m^2 は1または2の整数である。当該糖鎖がN297糖鎖であり、糖鎖がN297- (Fuc) MSG1、N297- (Fuc) MSG2又はN297- (Fuc) MSG1とN297- (Fuc) MSG2の混合物の場合、 m^2 は1であり、DARは1〜3の範囲 (好ましくは、1.0〜2.5の範囲、より好ましくは、1.2〜2.2の範囲) である。N297糖鎖が、N297- (Fuc) SGの場合、 m^2 は2であり、DARは3〜5の範囲 (好ましくは、3.2〜4.8の範囲であり、より好ましくは、3.5〜4.2の範囲) である。

なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、ピロロベンゾジアゼピン誘導体の結合数をコントロールした抗体を取得することができる。

[0187] なお、本発明の抗体—薬物コンジュゲート、遊離薬物又は製造中間体は、大気中に放置したり、又は再結晶することにより、水分を吸収し、吸着水がついたり、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物及び塩も本発明に包含される。

[0188] 本発明の抗体—薬物コンジュゲート、遊離薬物又は製造中間体が、アミノ基等の塩基性基を有する場合、所望により医薬的に許容される塩とすることができる。そのような塩としては、例えば塩酸塩、ヨウ化水素酸塩等のハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩等の低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等のアリールスルホン酸塩；ギ酸、酢酸、りんご酸、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及びオルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩等のアミノ酸塩を挙げ

ることができる。

[01 89] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート、遊離薬物又は製造中間体が、カルボキシ基等の酸性基を有する場合、一般的に塩基付加塩を形成することが可能である。医薬的に許容される塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩等の無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N－メチルダルカミン塩、ジェチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N－ジベンジルエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、N－ベンジル－N－(2－フェニルエトキシ)アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩等の有機アミン塩、等を挙げることができる。

[01 90] 本発明の抗体－薬物コンジュゲート、遊離薬物又は製造中間体は、空気中の水分を吸収すること等により水和物として存在することもある。本発明の溶媒和物としては、医薬的に許容し得るものであれば特に限定されないが、具体的には、水和物、エタノール和物、2_プロパノール和物等が好ましい。また、本発明の抗体－薬物コンジュゲート、遊離薬物又は製造中間体中に窒素原子が存在する場合にはN_オキシド体となってもよく、これら溶媒和物及びN_オキシド体も本発明の範囲に含まれる。

[01 91] また、本発明には、種々の放射性または非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の抗体－薬物コンジュゲート、遊離薬物又は製造中間体を構成する原子の1以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位体としては、例えば、重水素 (^2H)、トリチウム (^3H)、ヨウ素－125 (^{125}I) または炭素－14 (^{14}C) 等を挙げることができる。また、本発明化合物は、例えば、トリチウム (^3H)、ヨウ素－125 (^{125}I) または炭素－14 (^{14}C) のような放射性同位体で放射性標識され得る。放射性標識された化合物は、治療または予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。本発明の抗体－薬物コンジュゲート

の全ての同位体変異種は、放射性である与否とを問わず、本発明の範囲に含まれる。

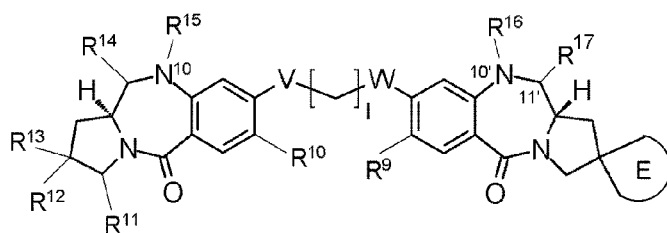
[01 92] [製造方法]

次に、本発明の抗体—薬物コンjugate及び遊離薬物あるいはそれらの製造中間体の代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式(1)の化合物』、『化合物(1)』等と称する。またこれ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[01 93] 1. 製造方法1

本発明の化合物(1)は、以下に記載するA法乃至Q法に従って製造することができる。

[化102]



(1)

A法乃至M法は本発明の抗体—薬物コンjugateにおける製造中間体の製造法である。

N法乃至Q法は本発明の遊離薬物の製造法である。

[01 94] 下記A法乃至Q法の各工程は公知の有機化学的手法を用いて所望の反応を行うことができる。

下記A法乃至Q法の各工程の反応において使用される溶媒は、反応を阻害せず、反応に悪影響を及ぼさず、出発原料をある程度溶解するものであれば特に限定はない。

下記A法乃至Q法の各工程の反応において、反応温度は、溶媒、出発原料、試薬等により異なり、反応時間は、溶媒、出発原料、試薬、反応温度等により異なる。

下記A法乃至Q法の各工程の反応において、反応終了後、各目的化合物は常法に従って、反応混合物から採取される。例えば、反応混合物を適宜中和し、又、不溶物が存在する場合には濾過により除去した後、水と酢酸エチルのような混和しない有機溶媒を加え、目的化合物を含む有機層を分離し、水等で洗浄後、無水硫酸マグネシウム、無水硫酸ナトリウム等で乾燥、ろ過後、溶剤を留去することによって得られる。得られた目的化合物は必要ならば、常法、例えば再結晶、再沈殿、クロマトグラフィー（例えば、シリカゲル、アルミナ、マグネシウム—シリカゲル系のフロリジル、 SO_3H —シリカ（富士シリシア製）のような担体を用いた吸着カラムクロマトグラフィー法；セファデックスLH—20（ファルマシア社製）、アンバーライトXAD—11（ローム・アンド・ハース社製）、ダイヤイオンHP—20（三菱化学社製）のような担体を用いた分配カラムクロマトグラフィー等の合成吸着剤を使用する方法；イオン交換クロマトを使用する方法；シリカゲル若しくはアルキル化シリカゲルによる順相・逆相カラムクロマトグラフィー法（好適には、高速液体クロマトグラフィー）を適宜組合せ、適切な溶離剤で溶出する）等の通常、有機化合物の分離精製に慣用されている方法を適宜組合せ、分離、精製することができる。溶媒に不溶の目的化合物では、得られた固体の粗生成物を溶媒で洗浄して、精製することができる。また、各工程の目的化合物は精製することなくそのまま次の反応に使用することもできる。

[01 95] 下記A法乃至Q法の各工程の反応において、J、 La' 、 Lp' 、 B' 、E、V、W、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} 、 L^7 、 n^6 、 m^1 は前述したものと同義を示す。 $(\text{Lp}')'$ は-VA-、-FG-、-PI-、-VCit-、-VK-、-(D-)PI-、-PL-、-(D-)VA-、-GF-で示されるいずれかのジペプチド残基を示す。 $(\text{R}^3)'$ は C^3 の置換基上に水酸基、アミノ基があつた場合保護基を使用してもよく、保護基が無い場合は R^{13} を示す。 $(\text{R}^{17})'$ はtert—ブチルジメチルシリルオキシ基などの保護基で水酸基が保護された状態または R^{17} いずれかを示す。

[01 96] PRO^1 、 PRO^4 、 PRO^6 、 PRO^8 、 PRO^9 はアミノ基の保護基を示す。好適には、 PRO^1 、 PRO^4 、 PRO^8 、 PRO^9 はアリルオキシカルボニル基、2,2,2—トリクロロエチルオ

キシカルボニル基、トリメチルシリルエトキシメトキシ基、ベンジルオキシカルボニル基または9_フルオレニルメチルオキシカルボニル基等である。またPRO⁶は好適には2_ (トリメチルシリル)エトキシメチル基、メトキシメチル基等である。

また、PRO²、PRO³、PRO⁵、PRO⁷、PRO¹⁰、PRO¹¹、PRO¹²は、有機合成化学の分野で使用されるヒドロキシ基、フェノール基またはカルボキシ基の保護基を示す。好適には、アセチル基、ベンジル基、tert_ブチルジメチルシリル (BDMs) 基又はトリイソプロピルシリル基またはtert_ブチル基である。

[01 97] X²は有機合成化学の分野で使用される脱離基を示す。好適には塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メタンスルホニル基、p_トルエンスルホニル基である。

R^a、R^cはカルボキシ基に結合した置換基を示し、好適にはメチル基、エチル基、ベンジル基、tert_ブチル基などである。

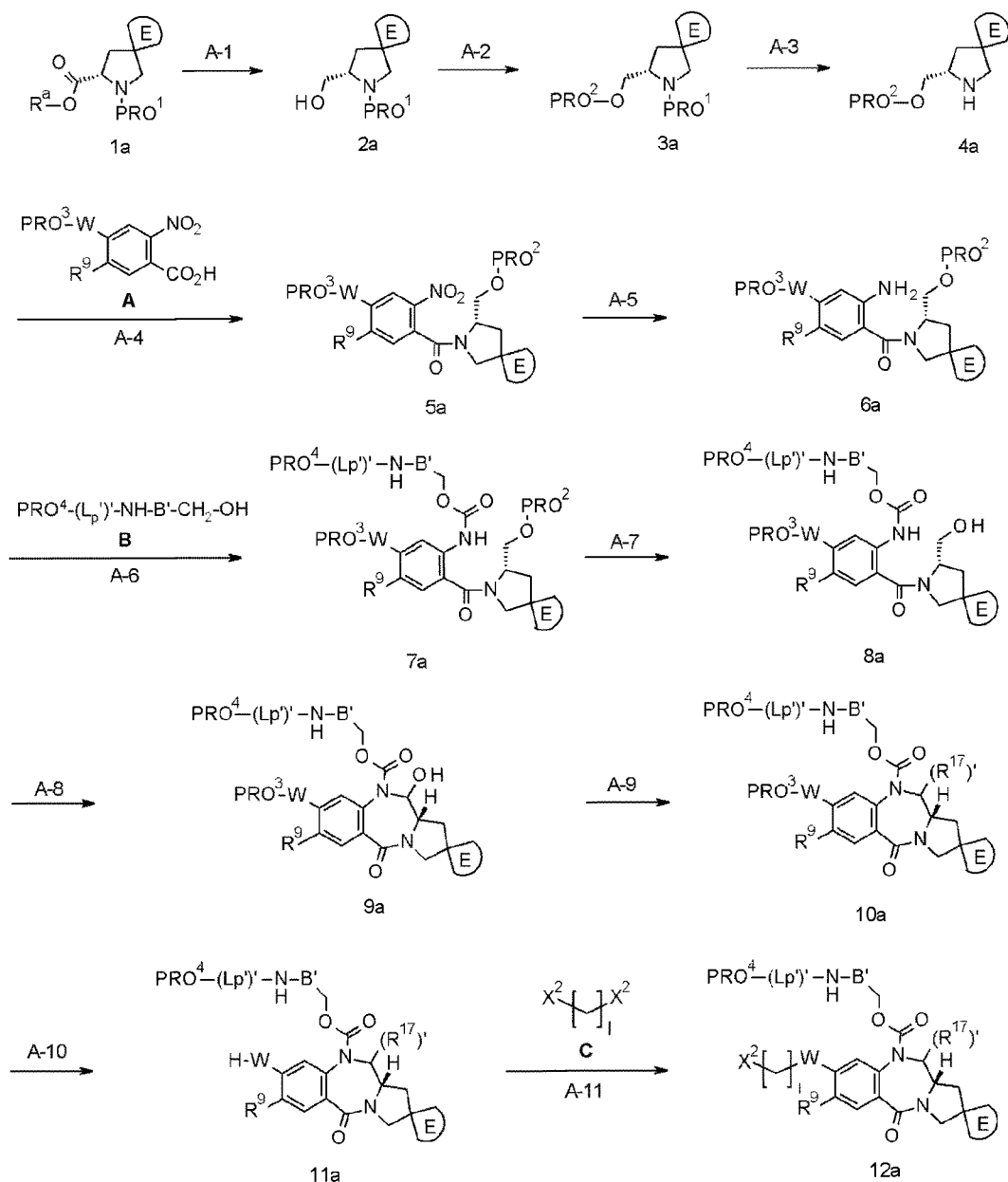
R^bはエノールスルホネートを形成する脱離基を示し、好適にはトリフルオロメタンスルホニル基等である。

また、A法乃至Q法で保護に関して明示していないアミノ基、ヒドロキシ基は、必要に応じて保護基を使用し、保護してもよい。また、必要に応じて脱保護もしてよく、保護した後、脱保護を行い、別の保護基を付け替えてもよい。

[01 98] A法

本製造法は化合物 (1) を製造するために必要な合成中間体、化合物 (1 2a) を製造する方法である。

[化 103]



[0199] A-1工程 (1a) → (2a) :還元反応

化合物 (1a) を溶媒 (ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン (THF)、ジクロロメタン、エタノール等またはそれらの混合溶媒) 中で、 -78°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは -78°C から 50°C までにおいて、還元剤 (水素化リチウムアルミニウム、ジボラン、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素ナトリウム、ボラン-テトラヒドロフラン錯体又は水素化ビス (2-

メトキシエトキシ)アルミニウムナトリウム等)で処理することによって行われる。還元剤は、化合物 (1a) に対して1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。必要に応じて、ルイス酸 (塩化リチウム、塩化カルシウム、塩化スズ、トリフルオロボランエーテル錯体など)を加えて行う。反応時間は1分から60時間、好ましくは5分から24時間である。

[0200] A₂ 工程 (2a) → (3a) :保護基導入 (tert - プチルジメチルシリル基、など)

PRO²がTBDMS基の場合、化合物 (2a) を溶媒 (ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 等又はそれらの混合溶媒) 中で、-20℃から120℃まで、好ましくは0℃から100℃において、シリル化試剤 (塩化tert - プチルジメチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸tert - プチルジメチルシリル等)と反応させて実施する。必要に応じて、塩基 (イミダゾール、ピリジン、2, 6-ルチジン、4-ジメチルアミノピリジン、水素化ナトリウム等)を加えて行う。化合物 (2a) の1モルに対して、シリル化剤は1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用い、塩基は1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。反応時間は1分から72時間、好ましくは5分から24時間である。

[0201] A-3工程 (3a) → (4a) :脱保護基化反応

PRO¹がベンジルオキシカルボニル基の場合、化合物 (3a) を溶媒 (エタノール、プロパノール、メタノール、酢酸エチル、THF、1, 4-ジオキサン等又はそれらの混合溶媒) 中で、遷移金属触媒 (パラジウム炭素等) 存在下、0℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、接触水素化させることによって実施する。通常水素雰囲気下で行うが、必要に応じて、水素供与体としてシクロヘキセン、1, 4-シクロヘキサジェン等を用いても良い。反応時間は10分から100時間、好ましくは30分から72時間である。

[0202] A-4工程 (4a) → (5a) :縮合反応

化合物 (4a) を溶媒 (ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、THF、DMF、水等またはそれらの混合溶媒) 中で、-30℃から反応に

用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、0-(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ボレート、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド等の縮合剤の存在下、カルボン酸(化合物(A))と反応させて実施する。縮合剤は、化合物(4a)の1モルに対して、カルボン酸(化合物(A))は0.3から5モル、好ましくは0.4から2モルを用い、縮合剤は1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。また、必要に応じて塩基(トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、4-ジメチルアミノピリジン等)および添加剤(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール等)を加えて行う。塩基は、化合物(4a)の1モルに対して触媒量から過剰モル、好ましくは0.2から3モルを用いる。添加剤は、化合物(4a)の1モルに対して触媒量から過剰量、好ましくは0.01から3モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

また、カルボン酸(化合物(A))を酸ハロゲン化物にして縮合反応する場合、化合物(4a)を溶媒(ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、ジクロロメタン等又はそれらの混合溶媒)中で、-78℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは-50℃から100℃において、塩基(トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、4-ジメチルアミノピリジン等)の存在下、カルボン酸(化合物(A))の酸ハロゲン化物と反応させて実施する。化合物(4a)の1モルに対して、酸ハロゲン化物は0.3モルから5モル、好ましくは0.4モルから2モルを用い、塩基は触媒量から過剰モル、好ましくは0.2から5モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

カルボン酸(化合物(A))の酸ハロゲン化合物を調製するには、カルボン酸(化合物(A))を溶媒(ベンゼン、トルエン、ジクロロメタン、ジクロロ

エタン等、またはそれらの混合溶媒) 中で、0℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から100℃において、塩化オキサリル、塩化チオニル等で処理することで実施する。必要に応じて、触媒量のN,N-ジメチルホルムアミド等を加えて行う。カルボン酸(化合物(A))に対し、塩化オキサリルまたは塩化チオニルは1から過剰モル、好ましくは1から10モル用いる。反応時間は、10分から72時間、好ましくは30分から24時間で行う。

[0203] A-5工程 (5a) → (6a) :還元反応

化合物(5a)を溶媒(エタノール、プロパノール、メタノール、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF等又はそれらの混合溶媒)中で、遷移金属触媒(パラジウム炭素、ニッケル等)存在下、0℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、接触水素化させることによって実施する。通常水素雰囲気下で行うが、必要に応じて、水素供与体としてシクロヘキセン、1,4-シクロヘキサジェン、ヒドラジン等を用いても良い。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

また、ニトロ基の還元は以下の条件でも行うことができる。

化合物(5a)を溶媒(エタノール、メタノール、ジエチルエーテル、酢酸エチル、水又はそれらの混合溶媒)中で、0℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から90℃において、還元剤(鉄、亜鉛、塩化スズなど)と反応させて実施する。必要に応じて、酸(酢酸、ギ酸、塩化アンモニウム等)を加えて行う。化合物(5a)の1モルに対して、還元剤は1から過剰モル、好ましくは1から100モルを用い、酸は1から過剰モル加えて行う。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0204] A-6工程 (6a) → (7a) :カルバメート化反応

化合物(6a)を溶媒(THF、ジクロロメタン、DMF等又はそれらの混合溶媒)中で、-30℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、トリホスゲン(イソシアネート化剤)と反応させ、イソシアネート中間体を系内で発生させた後、一般式(B)で表されるアルコールで処理することで実施する。必要に応じて、塩基(トリエチルアミン、ジイソプロピル

エチルアミン、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム等)を加えて行う。化合物(6a)の1モルに対してトリホスゲン(イソシアネート化剤)は、0.3から過剰モル、好ましくは0.35から3モルを用い、塩基は、0.5から5モル加えて行う。イソシアネート中間体を形成するまでの反応時間は10分から24時間、好ましくは30分から1時間である。また、イソシアネート中間体とアルコール(B)との反応時間は、10分から72時間、好ましくは1時間から24時間である。

本工程で使用されるアルコール(B)は、後述するL法に従って製造することができる。

[0205] A—7工程 (7a) → (8a) :脱保護基化反応

PRO²がTBDMS基の場合、化合物(7a)を溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、アセトニトリル、メタノール、エタノール、THF、水等又はそれらの混合溶媒)中で、-20℃から100℃まで、好ましくは0℃から50℃において、酸(酢酸等)または脱シリル化試剤(フッ化水素酸-ピリジン、フッ化水素酸-トリエチルアミン、フッ化水素酸塩、フッ化水素酸、フッ化テトラ_n-プチルアンモニウム等)、およびこれらの混合物のいずれかと反応させて実施する。化合物(7a)の1モルに対して酸は1から過剰モル用い、酸および脱シリル化試剤は1から過剰モル好ましくは1から10モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0206] A—8工程 (8a) → (9a) :酸化反応

化合物(8a)を溶媒(アセトン、ジクロロメタン、ピリジン等又はそれらの混合溶媒)中、-78℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは-78℃から30℃までにおいて、酸化剤(クロロスルホニウム塩、デスマーチン試薬、テトラプチルアンモニウムルテネート、ピリジニウムクロロクロメート、ニトロキシラジカル酸化触媒等)と反応させて実施する。必要に応じて、塩基(トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム等)および再酸化剤(N-メチルモルホリン N-オキシド、ヨードベンゼンジアセテート、次亜塩素酸ナトリウム

等)や添加剤(テトラブチルアンモニウムブロミド、臭化カリウム等)を加えて行う。酸化剤は化合物(8a)の1モルに対して0.005から過剰モル、好ましくは0.005から10モルを用いる。また、化合物(8a)の1モルに対して塩基または再酸化剤は1から10モル、添加剤は0.02から1モルを加えて行う。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0207] A-9工程 (9a) → (10a) :保護基導入

(R¹⁷)、がtert-ブチルジメチルシリルオキシ基の場合、A-2工程に従って製造される。

[0208] A-10工程 (10a) → (11a) :脱保護基化反応

PRO³がトリイソプロピルシリル基の場合、化合物(10a)を溶媒(DMF、水等又はそれらの混合物)中で、0℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、酢酸リチウムで処理することで製造する。酢酸リチウムは、化合物(10a)の1モルに対して、1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

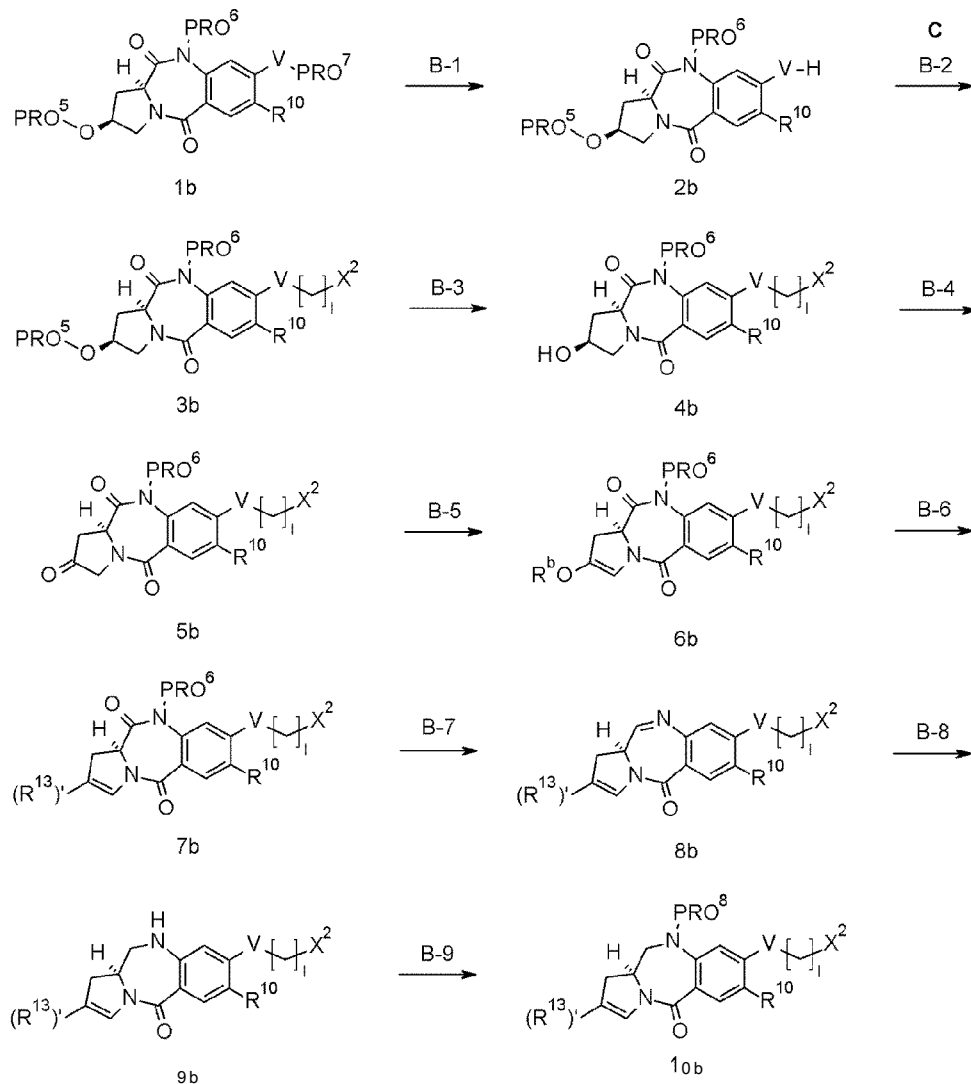
[0209] A-11工程 (11a) → (12a) :アルキル化反応

化合物(11a)を溶媒(THF、DMF、N,N-ジメチルアセトアミド又はそれらの混合溶媒)中で、-20℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から沸点までにおいて、アルキル化剤(C)(1,5-ジプロモペンタン、1,3-ジプロモプロパン等)と反応させることで製造される。必要に応じて、塩基(炭酸カリウム、炭酸セシウム等)を加えて行う。化合物(11a)の1モルに対して、アルキル化剤は1モルから過剰モル、好ましくは1から10モルを用い、塩基は0.4から過剰モル、好ましくは0.5から5モルを用いる。反応時間は1分から60時間、好ましくは5分から24時間である。

[0210] B法

本製造法は化合物(1)のうち、R¹¹とR¹²が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、R¹⁴、R¹⁵が水素である化合物を製造するために必要な中間体、化合物(10b)を製造する方法である。

[化 104]



[021 1] B—1工程 (1b) $\rightarrow$ (2b) :脱保護基化反応

PRO⁷が トリイソプロピルシリル基の場合、A法A_ 10工程に従って製造される。

。

PRO⁷がベンジル基の場合、A法A- 3工程に従って製造される。

[021 2] B—2工程 (2b) $\rightarrow$ (3b) :アルキル化反応

A法A_ 11工程に従って製造される。

[021 3] B—3工程 (3b) $\rightarrow$ (4b) :脱保護基化反応

PRO⁵が TBDMS基の場合、A法A_ 7工程に従って製造される。

Pro⁵がアセチル基の場合、化合物 (3b) を溶媒 (メタノール、エタノール、

THF又は水等又はそれらの混合溶媒)中で -20°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 0°C から 50°C において、適当な塩基(炭酸カリウム、ナトリウムメトキシドまた水酸化ナトリウム等)を反応させて実施する。塩基の量としては触媒量から過剰モル、好ましくは0.1から10モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0214] B—4工程 (4b) $\rightarrow$ (5b) :酸化反応

A法A_8工程に従って製造される。

[0215] B_5工程 (5b) $\rightarrow$ (6b) :エノールスルホン化反応

がトリフルオロメタンスルホン基の場合、化合物(5b)を溶媒(ジクロロメタン等)中で、 -78°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは -78°C から 30°C において、トリフルオロメタンスルホン酸無水物等を反応させて実施する。必要に応じて、塩基($2,6$ -ルチジン等)を加えて行う。トリフルオロメタンスルホン酸無水物は化合物(5b)の1モルに対して1モルから過剰モル、好ましくは1モルから5モルを用いる。塩基は1モルから10モルを用いる。反応時間は10分から24時間、好ましくは30分から6時間である。

[0216] B_6工程 (6b) $\rightarrow$ (7b) :遷移金属触媒クロスカップリング反応(例えば、鈴木—宮浦反応等)

化合物(6b)を溶媒(エタノール、トルエン、 $1,4$ -ジオキサン、DMF、テトラヒドロフラン、水等又はこれらの混合溶媒)中で、 0°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 0°C から 120°C において、遷移金属触媒(テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム、ジクロロビス(ベンゾニトリル)パラジウム(II)等)存在下、有機ホウ素化合物(4 -メトキシフェニルボロン酸等)を用いて実施する。必要に応じて、塩基(炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム等)、添加剤(酸化銀、トリフェニルアルシン等)を加えて行う。パラジウム触媒は化合物(6b)の1モルに対して0.01モルから1モル、好ましくは0.01モルから0.5モルを用いる。また、化合物(6b)の1モルに対して、有機ホウ素化合物は1モルから過剰モル、好ましくは1モルから10モルを用い、塩基は1モ

ルから5モル、添加剤は0.1モルから5モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[021 7] B-7工程 (7b) → (8b) :還元反応

例えばPRO⁶が2_ (トリメチルシリル)エトキシメチル基の場合、化合物 (7b) を溶媒 (ジエチルエーテル、THF、ジクロロメタン、エタノール等またはそれらの混合溶媒) 中で、-78℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは-78℃から50℃までにおいて、還元剤 (水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素ナトリウム等) で処理することによって行われる。還元剤は、化合物 (7b) に対して1から過剰モル、好ましくは1から30モルを用いる。反応時間は1分から24時間、好ましくは5分から6時間である。還元反応によって得られる粗生成物の溶液 (ジクロロメタン、エタノール、水またはそれらの混合溶媒) に、シリカゲルを加え、攪拌処理することで化合物 (8b) を製造することができる。シリカゲルは、化合物 (7b) に対して過剰量用いる。処理時間は、12時間から150時間、好ましくは12時間から100時間である。

[021 8] B_8 工程 (8b) → (9b) :イミノ基の還元

化合物 (8b) を溶媒 (THF、ジクロロメタン、N,N-ジメチルホルアミド等またはそれらの混合溶媒) 中で、-78℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは-78℃から50℃までにおいて、還元剤 (水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム、2_ピコリンボラン、ピリジンボラン等) で処理することによって行われる。還元剤は、化合物 (8b) に対して1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。反応時間は1分から60時間、好ましくは5分から24時間である。

[021 9] B-9工程 (9b) → (10b) :保護基の導入

PRO⁸がアリルオキシカルボニル基の場合、(9b) を溶媒 (ベンゼン、トルエン、ピリジン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、THF、1,4_ジオキサン、水等又はそれらの混合溶媒) 中で、-30℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、クロロギ酸アリル、ジ炭酸ジアリルエステル等と反応させて実施する。必要に応じて、塩基 (トリエチルアミン、

ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム等)を加えて行う。化合物(9b)の1モルに対して、クロロギ酸アリルは1モルから過剰モル、好ましくは1モルから10モル用い、塩基は1モルから過剰量、好ましくは1から10モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは10分から48時間である。

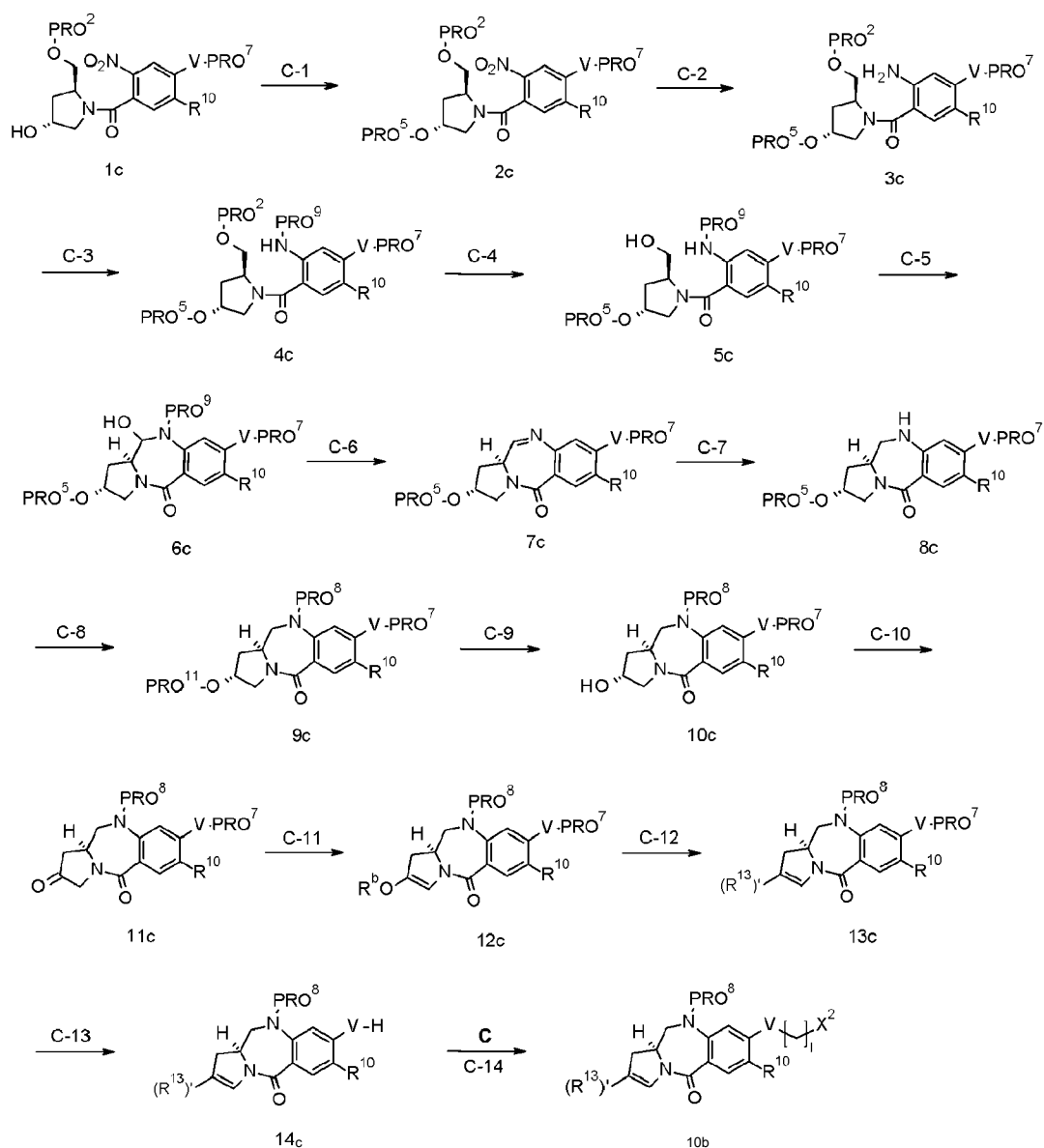
PRO⁸が2', 2', 2' - トリクロロエトキシカルボニル基の場合、

化合物(9b)を溶媒(ベンゼン、トルエン、ピリジン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、THF、1,4-ジオキサン、水等又はそれらの混合溶媒)中で、-30℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から50℃において、クロロギ酸2,2,2-トリクロロエチル等と反応させて実施する。必要に応じて、塩基(トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム等)を加えて行う。化合物(9b)の1モルに対して、クロロギ酸2,2,2-トリクロロエチルは1モルから過剰モル、好ましくは1モルから10モル用い、塩基は1モルから過剰量、好ましくは1から10モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から48時間である。

[0220] c法

本製造法は化合物(1)のうち、R¹¹とR¹²が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、R¹⁴、R¹⁵が水素である化合物を製造するために必要な中間体、化合物(14c)を製造する方法である。また化合物(10b)は、本製造法でも製造することができる。

[化 105]



[0221] C-1工程 (1c) → (2c) :保護基の導入

PRO⁵がアセチル基の場合、化合物 (1c) を溶媒 (ジクロロメタン、DMF、ピリジン、THF、1,4-ジオキサン等又はそれらの混合溶媒) 中で、-20℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から100℃において、アセチル化試剤 (無水酢酸、塩化アセチル等) と反応させて実施する。必要に応じて、塩基 (トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等) を加えて行う。化合物 (1c) の1モルに対してアセチル化剤は1モルから過剰モル、好ましくは1モルから20モル、塩基は触媒量

から過剰モル、好ましくは0.1から20モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

PRO⁵がTBDMS基の場合、A法A₂工程に従って製造される

[0222] C₂工程〜C₅工程及びC₇工程〜(C₁₄工程

C₂工程はA法のA₅工程、C₃工程はB法のB₉工程、C₄工程はA法A₇工程、C₅工程はA法A₈工程、C₇工程はB法B₈工程、C₈工程はB法のB₉工程、C₉工程はB法B₃工程、C₁₀工程はA法のA₈工程、C₁₁工程はB法のB₅工程、C₁₂工程はB法のB₆工程、C₁₃工程はA法のA₁₀工程、C₁₄工程はA法A₁₁工程に従って製造される。

[0223] C₆工程 (6c) → (7c) :脱保護基化反応

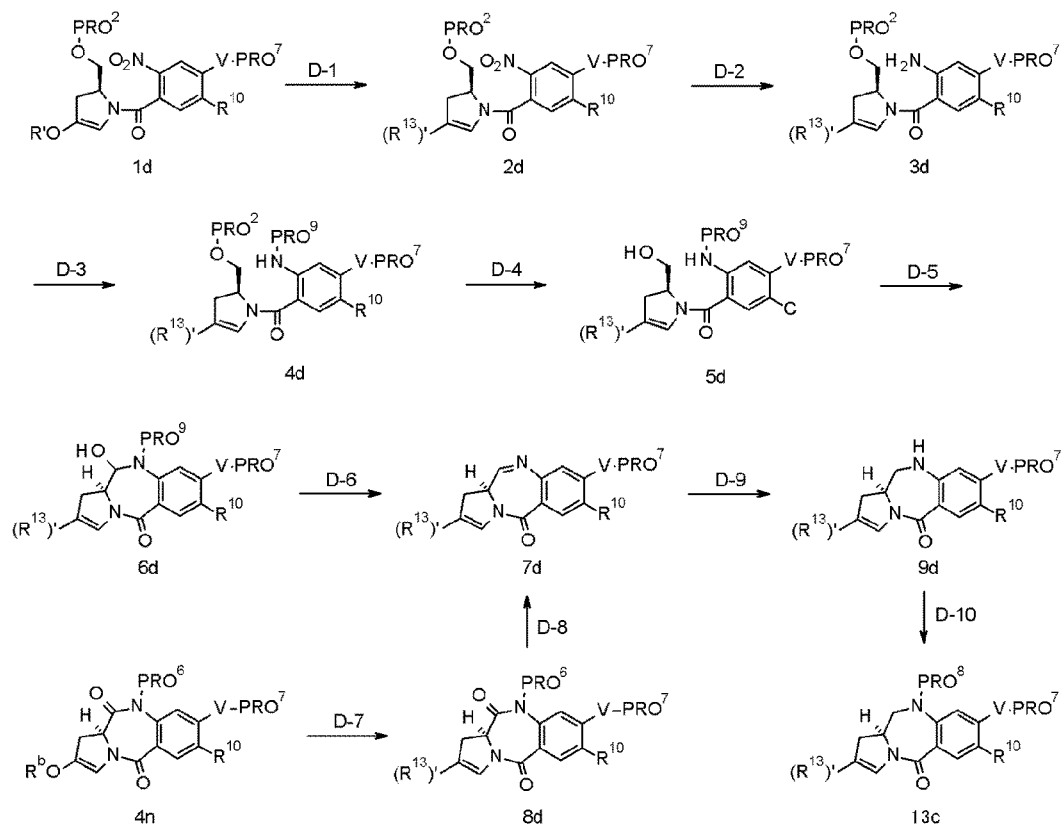
PRO⁹が2', 2', 2'-トリクロロエトキシカルボニル基の場合、化合物 (6c) を溶媒 (THF、酢酸、酢酸アンモニウム水溶液、水等又はそれらの混合溶媒) 中で、₂₀℃から溶媒の沸点、好ましくは0℃から40℃において、金属試薬 (亜鉛、亜鉛-鉛合金、カドミウム、カドミウム鉛、等) と反応させて実施する。金属試薬は、化合物 (6c) の1モルに対して1から過剰モル、好ましくは1から10モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

PRO⁹がアリルオキシカルボニル基の場合、化合物 (6c) を溶媒 (ジクロロメタン、DMF、THF等又はそれらの混合物) 中で、0℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃から30℃において、パラジウム触媒 (テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウムなど) とアリル基の捕捉剤 (ピロリジン、モルホリン、バルビツール酸等) を用いて実施する。パラジウム触媒は化合物 (6c) の1モルに対して0.005モルから1モル、好ましくは0.005モルから0.5モルを用いる。アリル基の捕捉剤は1モルから過剰モル、好ましくは1モルから10モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0224] D法

化合物 (13c) は、本法でも製造することができる。

[化106]



[0225] D_1工程〜D_6工程、D_9工程、D_10工程

D_1工程はB法のB_6工程、D_2工程はA法のA_5工程、D_3工程はB法のB_9工程、D_4工程はA法のA_7工程、D_5工程はA法のA_8工程、D_6工程はC法のC_6工程、D_9工程はB法のB_8工程、D_10工程はB法のB_9工程に従って製造される。

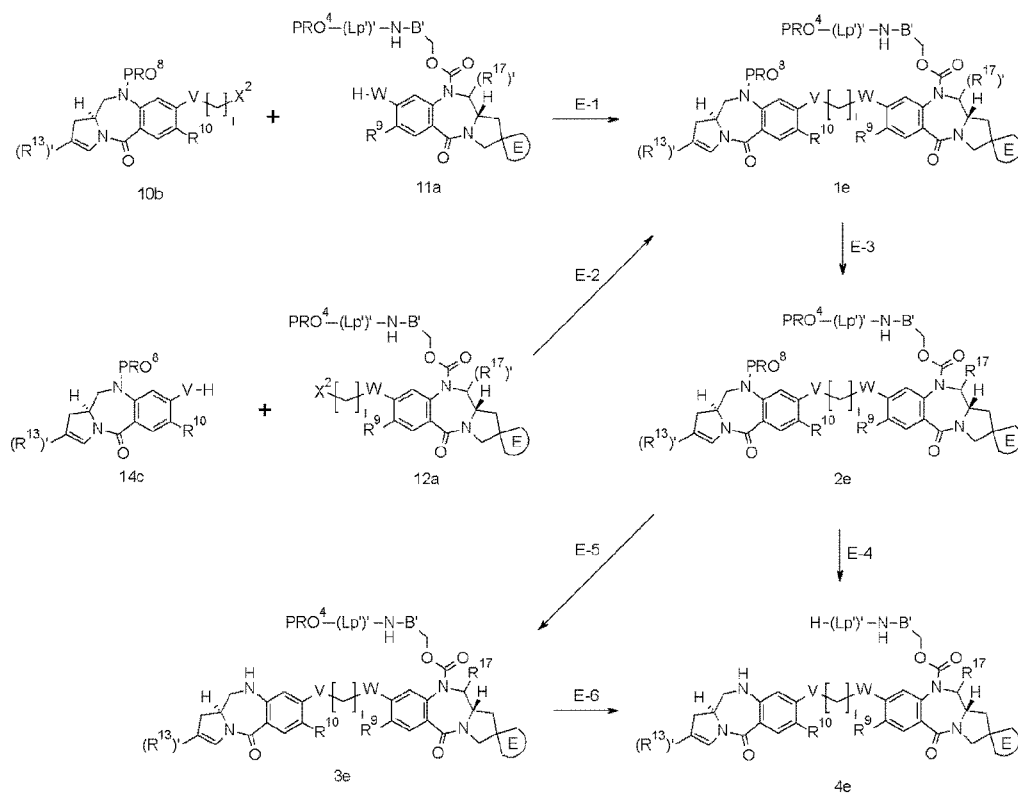
[0226] D_7工程及びD_8工程

化合物 (7d) は、B法のB_6工程と同様のD_7工程、B法のB_7工程と同様のD_8工程に従い製造することもできる。

[0227] E法

E法は、A法で製造される化合物 (1a) 及び (12a) とB法またはC法で製造される化合物 (10b) 及び (14c) を結合させ化合物 (4e) を製造する方法である。

[化 107]



[0228] E_1 工程

本工程は、A法で製造される化合物 (11a) とB法で製造される化合物 (10b) のカップリング反応により、化合物 (1e) を製造する工程である。

化合物 (11a) を溶媒 (THF、DMF、N, N_ ジメチルアセトアミド又はそれらの混合溶媒) 中で、 -20°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 0°C から 50°C までにおいて、塩基 (炭酸カリウム、炭酸セシウム等) 存在下、化合物 (10b) とカップリング反応させることで製造される。化合物 (10b) は、化合物 (11a) の0.5モルに対して1モルから過剰モル、好ましくは0.7から1.5モルを用いる。塩基は1から5モルを用いる。反応時間は1分から60時間、好ましくは5分から24時間である。

[0229] E_2 工程

化合物 (1e) は、A法で製造される化合物 (12a) とC法で製造される化合物 (14c) に対して、E_1工程と同様にカップリング反応を行うことでも製造す

ることができる。

[0230] E—3工程

E_3工程は、A法A—7工程に従って製造される。

[0231] E-4工程

本工程は、化合物 (2e) で PRO^4 と PRO^8 が同じ保護基の場合、C法C—6工程と同様に脱保護基化反応させることにより化合物 (4e) を製造する工程である。

。

[0232] 化合物 (2e) の PRO^4 と PRO^8 が異なる保護基の場合、化合物 (4e) は脱保護化反応をE_5工程及びE_6工程を経て段階的に行うことで製造することもできる。

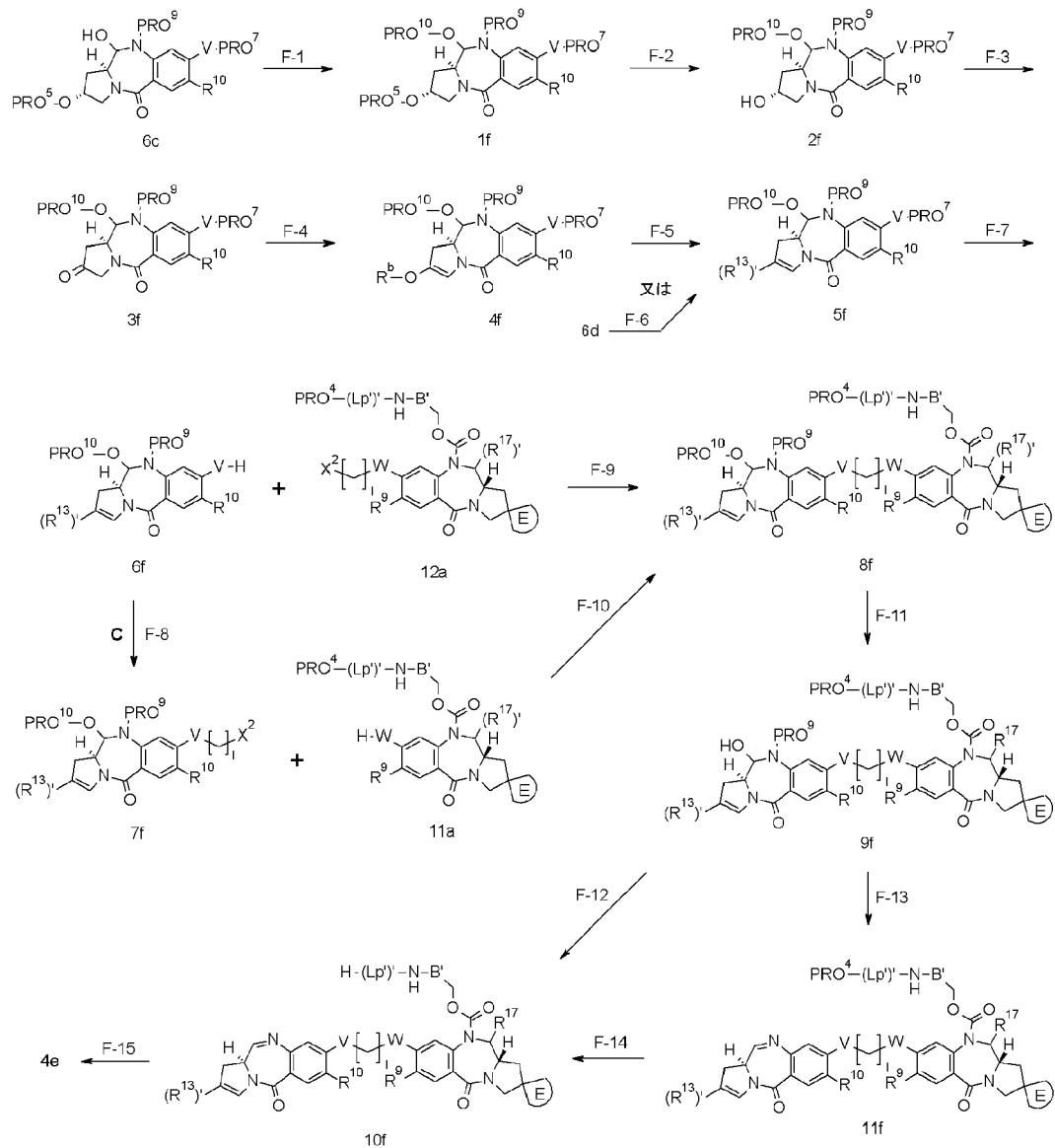
[0233] E_5工程及びE_6工程は、C法C_6工程に従って製造される。

[0234] F法

化合物 (4e) は、本合成法の間mediate化合物 (10f) から製造することができる。本製造法は、化合物 (10f) および化合物 (4e) を製造する方法を示す。

。

[化 108]



[0235] 「 1工程 〜 「 10工程、F_ 15工程

F_ 1工程はA法A_2 工程、F_ 2工程はB法B_3 工程、F—3工程はA法のA—8工程、F—4工程はB法のB—5工程、F—5工程はB法のB—6工程、F—6工程はA法A_ 2工法、F—7工程はA法のA—10工程、F—8工程はA法A—11工程、F—9工程はE法E—1工程、F—10工程はE法E—1工程、F—15工程はB法B—8工程に従って製造される。

[0236] F—11工程

PRO¹⁰と (R¹⁷) , における水酸基の保護基が共にTBDMS基の場合、A法A_7 エ

程に従って製造される。

[0237] F—12工程

本工程は化合物 (9f) で保護基 PRO^4 と PRO^9 が同じ場合、C法C—6工程と同様に脱保護基化反応させることにより化合物 (10f) を製造する工程である。

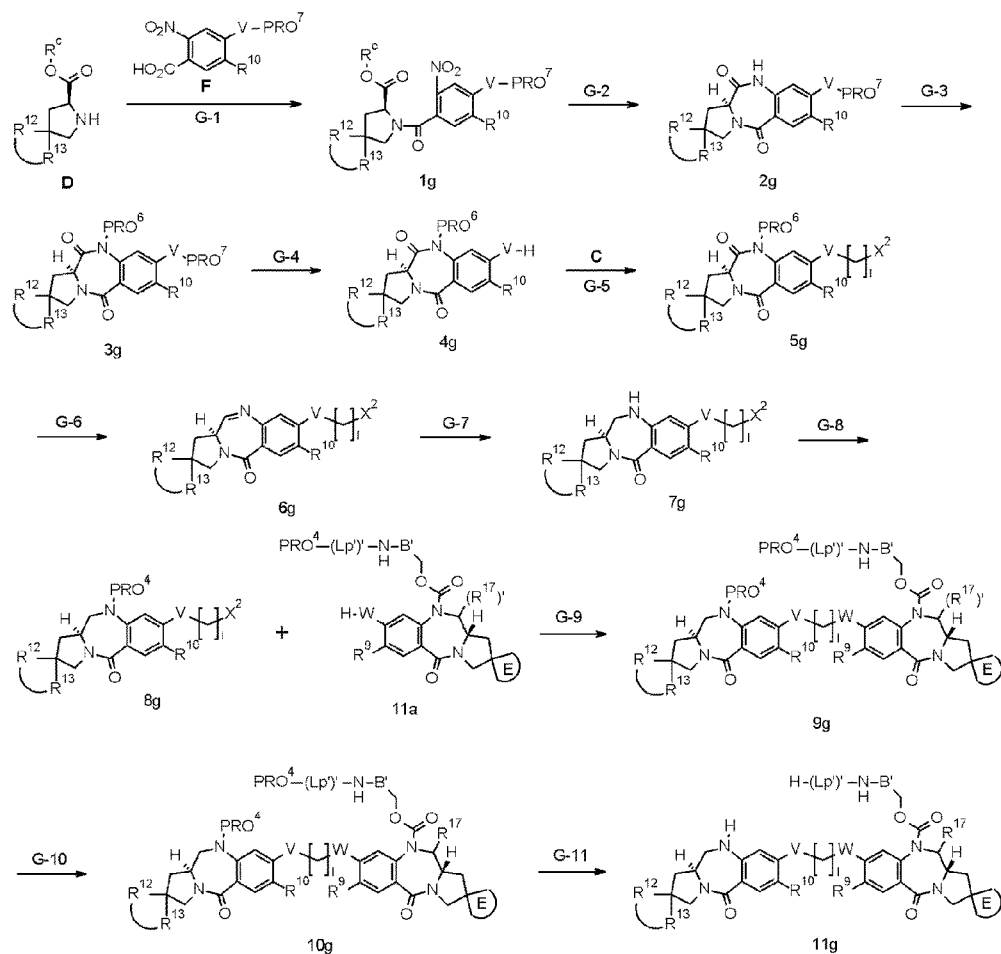
[0238] F—13工程及びF—14工程

化合物 (9f) の PRO^4 と PRO^9 が異なる保護基の場合、化合物 (10f) は脱保護基化反応をF—13工程及びF—14工程を経て段階的に行うことで製造することもできる。F—13工程及びF—14工程はC法C—6工程に従って製造される。

[0239] G法

本製造法は、化合物 (1) のうち、 R^{14} が水素原子を示し、 R^{12} 及び R^{13} は一緒になってスピロ環を形成し、 R^{14} 、 R^{15} が水素原子を示す化合物を製造するための中間体、化合物 (11g) を製造する方法である。

[化 109]



[0240] G₁〜G₂工程、G₅〜G₁₁工程、

G₁工程はA法の六₄工程、G₂工程はA法のA₅工程、G₅工程は六法六₁工程、G₆工程はB法B₇工程、G₇工程はB法B₈工程、G₈工程はB法B₉工程、G₉工程はE法E₁工程、G₁₀工程はA法A₇工程、G₁₁はC法C₆工程に従って製造される。

[0241] G₃工程 :保護基の導入

化合物 (2g) を溶媒 (THF、DMF、ジオキサン等またはそれらの混合溶媒) 中で、₇₈℃ から溶媒の沸点まで、好ましくは0℃ から50℃ において、クロロメトキシエーテル系試薬 (2₁ (クロロメトキシ) エチル トリメチルシラン、クロロメチルメチルエーテル、ベンジルクロロメチルエーテルなど) と反応させて実施する。必要に応じて、塩基 (水素化ナトリウム、n₁ プチルリチウム、ヘキサメチルジシラザンリチウム) を加えて行う。試薬は、化合物 (2g) の1モルに対して、1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。塩基は、化合物 (2g) の1モルに対して、1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0242] G₄工程

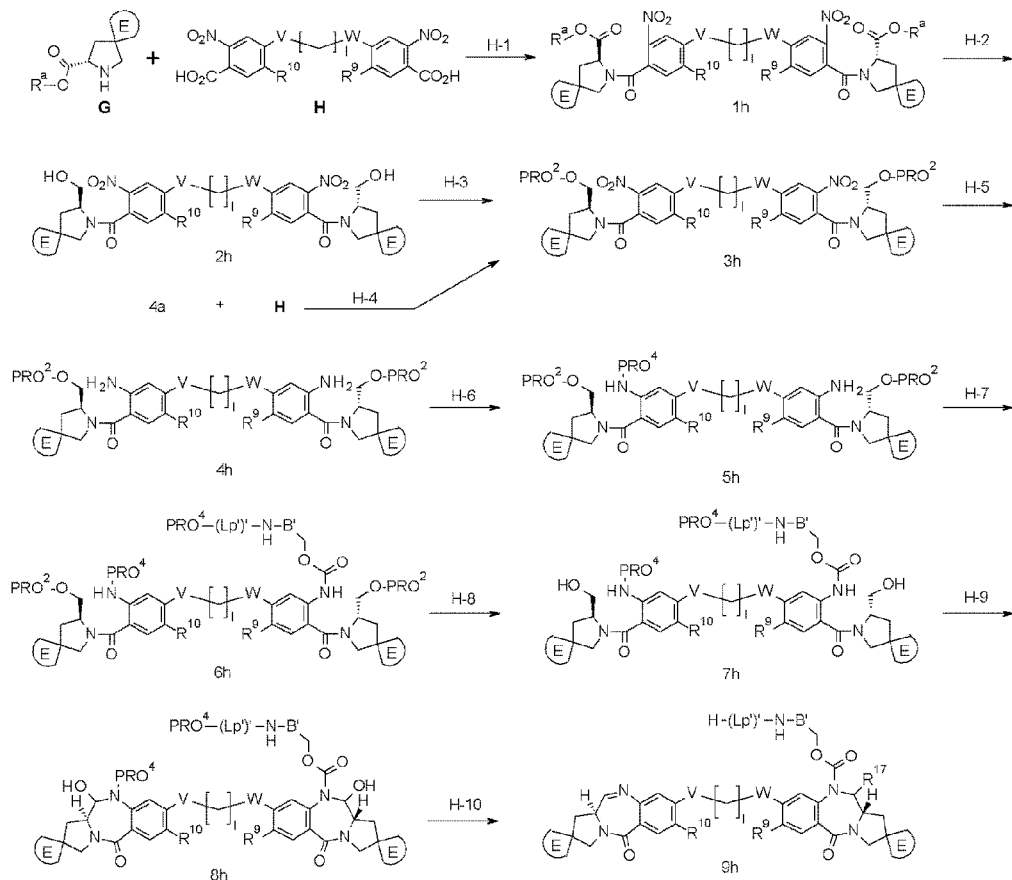
PRO⁷がベンジル基の場合、A法A₃工程に従って製造される。

PRO⁷がトリイソプロピルシリル基の場合、A法A₁₀工程に従って製造される。

[0243] H法

本製造法は、化合物 (1) のうち、R¹¹が水素原子を示し、R¹²及びR¹³は一緒になってスピロ環を形成し、R¹⁴、R¹⁵が一緒になって、イミン結合 (C = N) である化合物を製造するための中間体、化合物 (9h) を製造する方法である。本製造法においてはR¹²及びR¹³で形成するスピロ環はEと同義であるため、表記もEで示す。

[化 110]



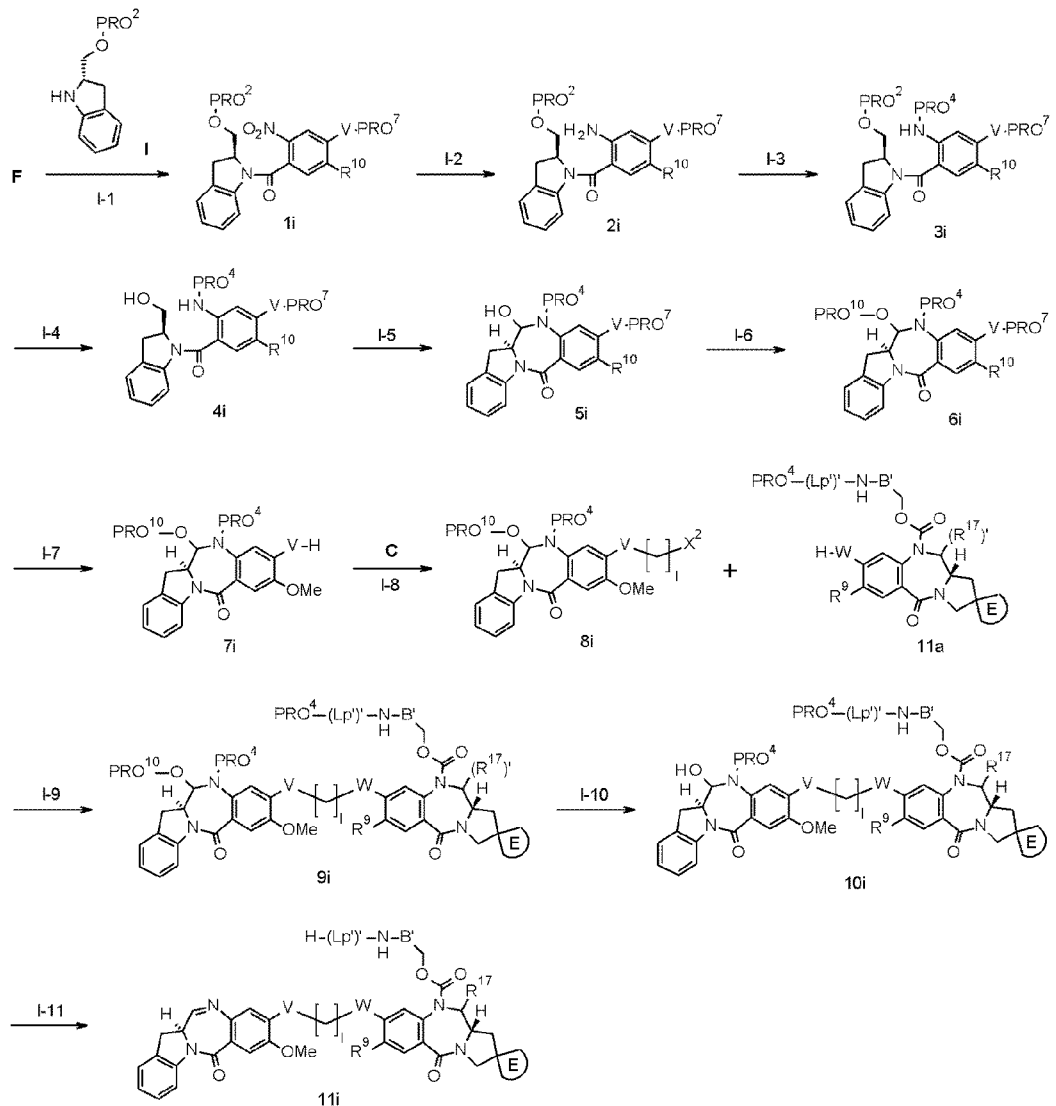
[0244] H_1工程～H_10工程

H_1工程はA法のA_4工程、H_2工程はA法のA_1工程、H_3工程はC法C_1工程、H_4工程はA法のA_4工程、H_5工程はA法のA_5工程、H_6工程はB法B_9工程、H_7工程はA法A_6工程、H_8工程はB法B_3工程、H_9工程はA法A_8工程、H_10工程はC法C—6工程に従って製造される。

[0245] I法

本製造法は化合物 (1) のうち、R¹¹とR¹²が一緒になってベンゼン環を形成し、R³は単結合であり、R¹⁴、R¹⁵が一緒になってイミンを形成する化合物を製造するための中間体、化合物 (11i) を製造する方法である。

[化111]



[0246] 1_1工程～1_11工程

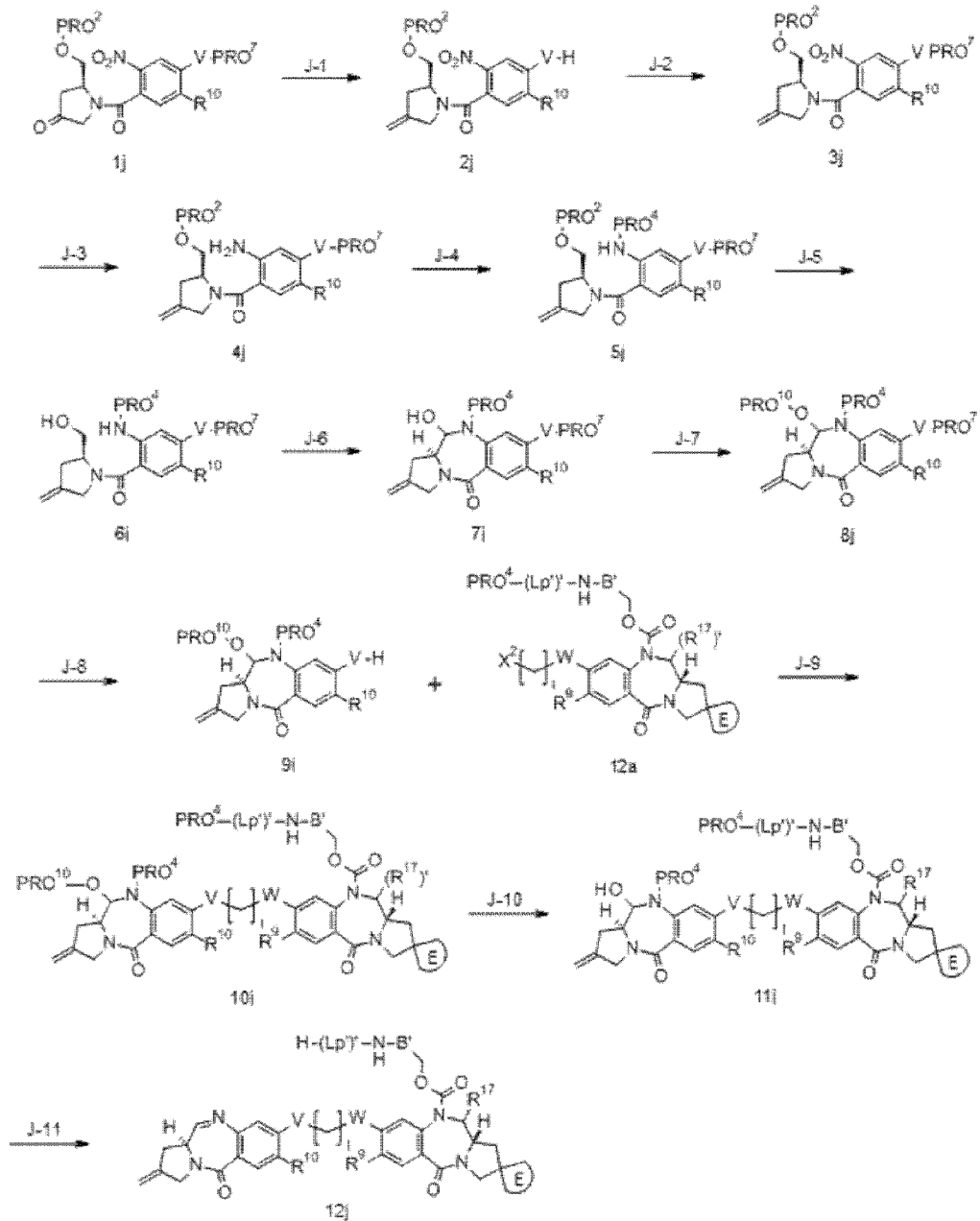
1_1工程はA法のA_4工程、1_2工程はA法のA_5工程、1_3工程はB法B_9工程、1_4工程はA法A_7工程、1_5工程はA法A_8工程、1_6工程は六法六_2工程、1_7工程はA法の六_10工程、1_8工程はA法の六_11工程、1_9工程はE法E—1工程、1_10工程はA法A_7工程、1_11工程はC法C_6工程に従って製造される。

[0247] J法

本製造法は化合物 (1) のうち、 R^2 と R^3 が一緒になって $CH_2=$ を形成し R^1 は水素で、 R^4 、 R^5 が一緒になってイミンを形成する化合物の中間体、化合物 (1)

2j) の製造方法である。

[化112]



[0248] J—1工程

本工程は、化合物 (1j) に対してwittig反応させることにより、化合物 (2j) を製造する工程である。

[0249] J—2工程 :保護基導入

PRO⁷がトリイソプロピルシリル基の場合、化合物 (2j) を溶媒 (ジクロロメ

タン、アセトニトリル、THF、DMF等又はそれらの混合溶媒)中で、 -20°C から 120°C まで、好ましくは 0°C から 100°C において、シリル化試剤 (トリイソプロピルシリルクロリド、トリイソプロピルシリルトリフレート等)と反応させて実施する。必要に応じて、塩基 (イミダゾール、ピリジン、2,6-ルチジン、4-ジメチルアミノピリジン、水素化ナトリウム等)を加えて行う。化合物 (2a) の1モルに対して、シリル化剤は1から過剰モル、好ましくは1から3モル用い、塩基は1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

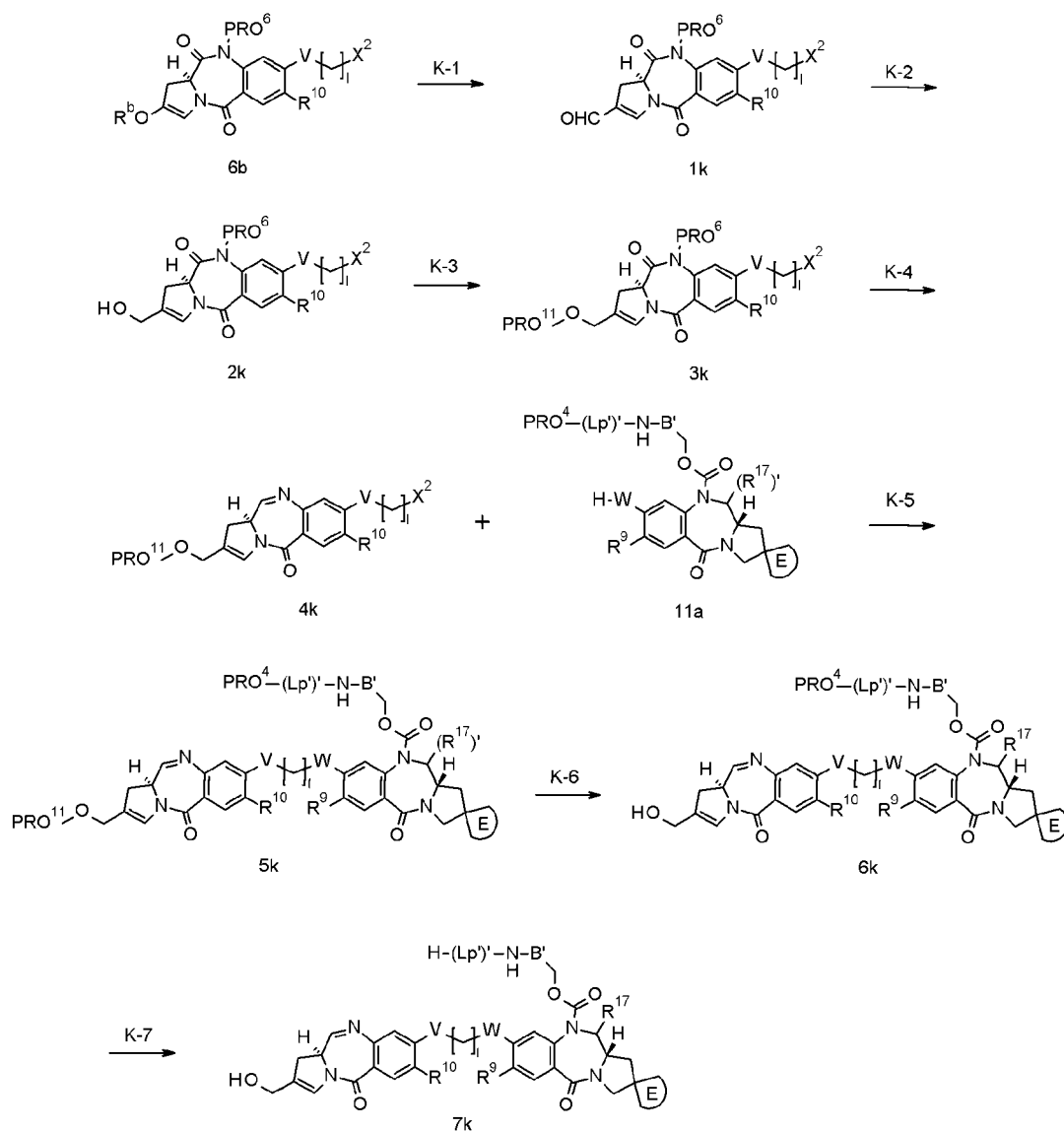
[0250] J—3工程〜J—11工程

J—3工程はA法のA—5工程、J—4工程はB法のB—9工程、J—5工程はA法A—7工程、J—6工程はA法A—8工程、J—7工程はA法A—2工程、J—8工程はA法のA—10工程、J—9工程はE法のE—1工程、J—10工程はA法A—7工程、J—11工程はC法C—6工程に従って製造される。

[0251] K法

K法は、化合物 (1) のうち、 R^{11} と R^{12} が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、 R^{13} はヒドロキシメチル基であり、 R^{14} 、 R^{15} が一緒になってイミンを形成する化合物を製造するために必要な中間体、化合物 (7k) を製造する方法である。

[化113]



[0252] K-1工程

本工程は、化合物 (6b) に対してカルボニル化反応を行い、化合物 (1k) を製造する工程である。

[0253] K-2工程

本工程は、化合物 (1k) に対してアルデヒド選択的な還元反応を行うことで、化合物 (2k) を製造する工程である。

[0254] K-3工程～K-7工程

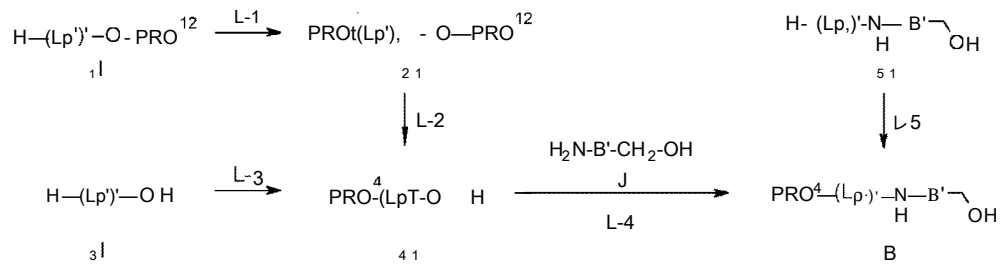
K-3工程はA法A-2工程、K-4工程はB法B_7工程、K_5工程はE法E_1工程

、K_6工程はA法A_7工程、K_7工程はC法C_6工程に従って製造される。

[0255] L法

L法は、化合物 (B) の代表的な製造方法である。

[化114]



[0256] 一般式 (Lp')' で表されるペプチド残基は、アミノ酸の縮合反応により製造できる。

PRO⁴はペプチド残基 (Lp')' のN末端を保護しており、PRO¹²はC末端を保護している。

[0257] L-1工程

L-1工程は、B法B-9工程に従って製造される。

[0258] L-2工程 : 脱保護基化反応

PRO¹²がtert-ブチル基の場合、化合物 (2 l) を溶媒 (ジクロロメタン等) 中で、0℃ から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは0℃ から40℃ において、酸 (トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸、塩酸、酢酸等) と反応させて実施する。酸は、化合物 (2 l) の1モルに対して触媒量から過剰モル用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0259] L-3工程〜L-4工程

L-3工程はB法B-9工程、L-4工程はA法のA-4工程に従って製造される。

[0260] L-5工程

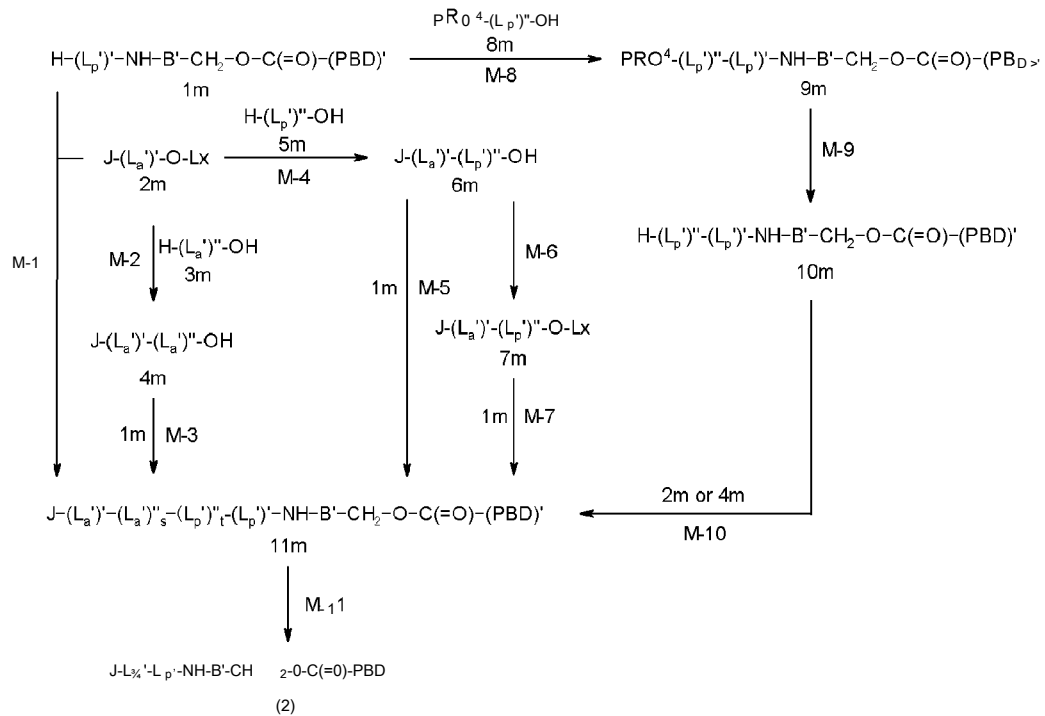
化合物 (B) は、B法B-9工程に従いL-5工程によっても製造することができる。

[0261] M法

M法は、化合物 (2) の製造方法である。

本製造方法に示される化合物 (2) は、化合物 (1) のうち、本発明の製造中間体における R^{16} が $J-(L_a)'-(L_p)'-NH-B'-CH_2-O-C(=O)-(PBD)^*$ と同義である。

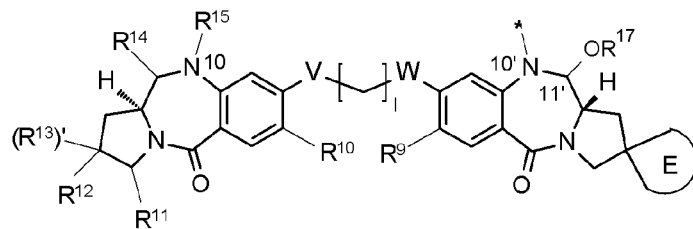
[化 115]



[0262] 上記製造方法に示される化合物 (1m) はE乃至K法で製造された化合物 (4e) , (4f) , (11g) , (9h) , (11i) , (12j) , (7k) , (8k) を表す。

[0263] 上記製造方法に示される (PBD)' は、

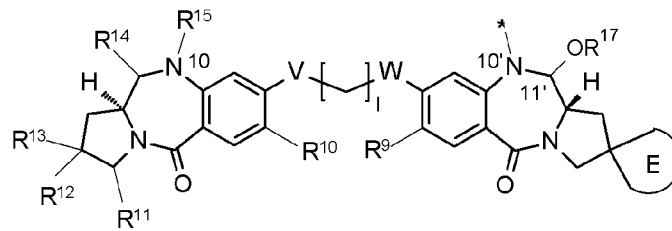
[化 116]



を示し、

PBDは

[化 117]



を示す。

(PBD) , はPBD中のRi³上の置換基 (水酸基等) が保護基で保護されていてもよく、保護基が無い場合はPBDと同義 (Ri³ = (Ri³) ,) である。

上記製造方法中に (Lp') " t - (Lp') , で示されるペプチド残基は、Lp' ' で示されるアミノ酸残基の側鎖上官能基 (アミノ基等) が保護基で保護されていてもよく、保護基が無置換の場合はLp' と同義である。

ここで、(Lp') , は、以下に示すような2個のアミノ酸配列を示し、側鎖に官能基 (アミノ基、水酸基) がある場合は保護されていてもよい。

-VA-、(D-)VA-、-FG-、-PI-、-VCit-、-VK-、-PL-、-(D-)P-I-、又は、-GF-

(Lp' , ' ' は、以下に示すような2〜4個のアミノ酸配列を示し、側鎖に官能基 (アミノ基、水酸基) が存在する場合は保護されていてもよい。

-GG-、-EGG-、-DG-、-(D-) DG-、-EG-、-GGF-、-SG-、-KG-、-DGG-、-GGF-、-DDGG-、-KDGG-、又は、-GGFG-

[0264] (La') , は以下の群から選択されるいずれか一つを示す。

-C(=O) - (CH₂CH₂)ⁿ⁶-C(=O) 、 -C(=O) - (CH₂CH₂)ⁿ⁶-NH-C(=O) - (CH₂CH₂O)ⁿ⁷-CH₂CH₂-C(=O)- 、 -(CH₂)ⁿ⁸-O-C(=O)- 、 -(CH₂)ⁿ¹²-C(=O)- 、 及び、
- (CH₂CH₂)ⁿ¹³-C(=O) -NH- (CH₂CH₂O)ⁿ¹⁴-CH₂CH₂-C(=O) -

[0265] (La') , , は以下の群から選択されるいずれか一つを示す。

-NH-(CH₂CH₂)ⁿ⁷-C(=O)- 、 又は、 -NH-(CH₂CH₂O)ⁿ⁷-CH₂-C(=O)- 、
sまたはtは各々独立して0または1を示す。

例えば、下記M-1工程はs及びtは0、M-3工程はsは1、tは0、M-5工程はsは0

、 t は 1 の 場 合 で あ る 。

[0266] (La') , $-$ (La') , s は La' と 同 義 で あ る 。

(Lp') ' t (Lp') , は 保 護 基 が 有 る 場 合 、 脱 保 護 す る こ と に よ り Lp' になるが、保護基が無い場合は Lp' と 同 義 で あ る 。

上 記 製 造 方 法 中 に 示 さ れ る Lx は 水 素 原 子 又 は 脱 離 基 (ヒ ド ロ キ シ ス ク シ ン イ ミ ド 等) を 示 す 。

上 記 製 造 方 法 中 に 示 さ れ る 1m、9m、10m、11m、化 合 物 (2) に お け る PBD 又 は (PBD) , は ア ス テ リ ス ク (N10' 位) で $_0C (=0)$ — の 右 端 の $C (=0)$ — と 結 合 し て い る こ と を 示 す 。

[0267] M — 1 工 程

本 工 程 は 、 E 乃 至 K 法 で 製 造 さ れ る 化 合 物 (1m) と 化 合 物 (2m) の 縮 合 反 応 を 行 い 、 化 合 物 (11m) を 製 造 す る 方 法 で あ る 。

$Lx = H$ で 化 合 物 (2m) が カ ル ボ ン 酸 の 場 合 、 A 法 A — 4 工 程 に 従 い 、 化 合 物 (2m) を 製 造 で き る 。

Lx が 脱 離 基 (ヒ ド ロ キ シ ス ク シ ン イ ミ ド や p -ニ ト ロ フ エ ノ キ シ 基 等) の 場 合 、 化 合 物 (1m) を 溶 媒 (ベ ン ゼ ン 、 ト ル エ ン 、 ジ エ チ ル エ ー テ ル 、 ジ ク ロ ロ メ タ ン 、 THF 、 DMF 、 メ タ ノ ール 、 水 等 ま た は そ れ ら の 混 合 溶 媒) 中 で 、 $-30^{\circ}C$ から 反 応 に 用 い る 溶 媒 の 沸 点 ま で 、 好 ま し く は $0^{\circ}C$ から $50^{\circ}C$ に お い て 、 イ 化 合 物 (2m) と 反 応 さ せ て 実 施 す る 。 化 合 物 (1m) の 1モ ル に 対 し て 化 合 物 (2m) は 0.9 から 過 剰 モ ル 、 好 ま し く は 0.9 から 2モ ル を 用 い る 。 ま た 、 必 要 に 応 じ て 、 塩 基 (ト リ エ チ ル ア ミ ン 、 N , N-ジ イ ソ プ ロ ピ ル エ チ ル ア ミ ン 、 N-メ チ ル モ ル ホ リ ン 、 4-ジ メ チ ル ア ミ ノ ピ リ ジ ン 、 ジ ア ザ ビ シ ク ロ ウ ン デ セ ン 等) を 加 え て 行 う 。 化 合 物 (1m) の 1モ ル に 対 し て 塩 基 は 、 1モ ル から 過 剰 量 、 好 ま し く は 1 から 5モ ル を 用 い る 。 反 応 時 間 は 10分 から 72時 間 、 好 ま し く は 30分 から 36時 間 で あ る 。

[0268] M — 2 工 程 ~ M — 5 工 程 及 び M — 8 工 程

V_2 工 程 は V_1 工 程 、 M — 3 工 程 は A 法 A — 4 工 程 、 V_4 工 程 は V_1 工 程 、 M — 5 工 程 は A 法 A — 4 工 程 、 M — 8 工 程 は A 法 A — 4 工 程 に 従 っ て 製 造 さ れ る 。

[0269] M- 6工程

本工程は、化合物 (6m) に対して、縮合反応を行い、活性エステル中間体 (7m) を製造する工程である。

化合物 (6m) を溶媒 (ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、THF、DMF等またはそれらの混合溶媒) 中で、 -30°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 0°C から 50°C において、N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等の縮合剤の存在下、ヒドロキシスクシンイミド等と反応させて実施する。縮合剤は、化合物 (6m) の1モルに対して1から過剰モル、好ましくは1から5モルを用いる。ヒドロキシスクシンイミドは、化合物 (6m) の1モルに対して1モルから過剰モル、好ましくは1モルから5モルを用いる。反応時間は10分から72時間、好ましくは30分から24時間である。

[0270] M—7工程

本工程は、化合物 (1m) と化合物 (7m) をM—1工程と同様に縮合反応を行い、化合物 (11m) を製造する工程である。

[0271] M_9 工程

本工程は、化合物 (9m) に対して、脱保護化反応を行い、化合物 (10m) を製造する工程である。PRO⁴が9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基の場合、化合物 (9m) を溶媒 (THF、ジクロロメタン、DMF等又はそれらの混合溶媒) 中で、 -20°C から溶媒の沸点、好ましくは 0°C から 40°C において、塩基 (1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] -7-ウンデセン, ピペリジン等) と反応させて実施する。化合物 (9m) の1モルに対して、塩基は1から過剰モル、好ましくは1から10モルを用いる。反応時間は1分から72時間、好ましくは5分から24時間である。

[0272] M—10工程

本工程は、化合物 (10m) と化合物 (2m) または (4m) をA法A—4工程と同様の縮合反応を行い、化合物 (11m) を製造する工程である。

[0273] M—11工程

本工程は、化合物 (11m) で $(\text{Lp}')'' - \text{t} - (\text{Lp}')$, または PBD' が保護基を有する場合、脱保護化を行うことで、化合物 (2) を製造する工程である。

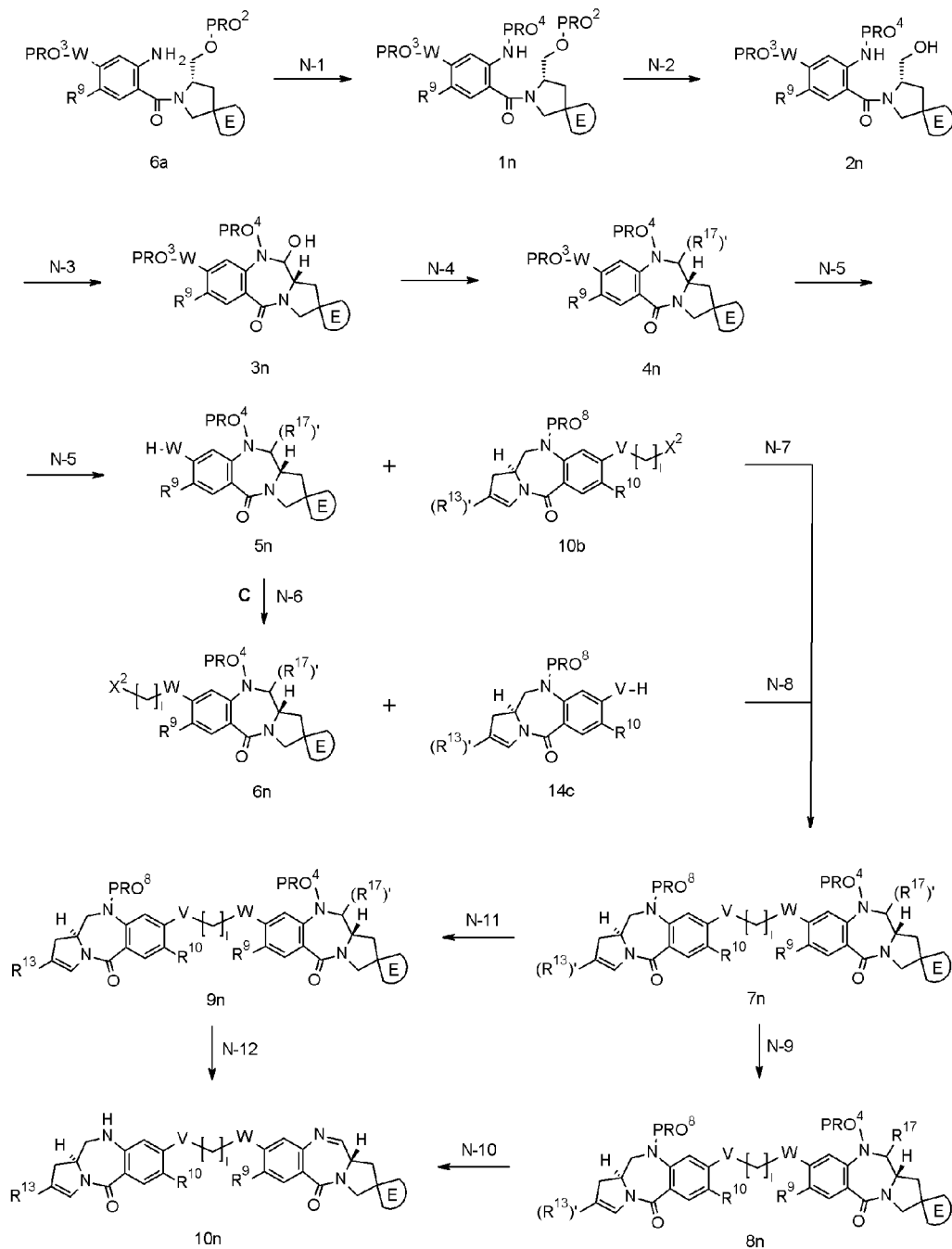
B法 B- 3工程 および C法 C- 6工程 に従って製造される。

また、 (Lp') , または PBD' に保護基がない場合 M_ 11工程は省略され、その場合、化合物 (11m) は (2) と同義である。

[0274] N法

N法は (1) で示される遊離薬物のうち、 R^{11} と R^{12} が一緒になってそれぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、 R^{14} 、 R^{15} が水素であり、 R^{16} と R^{17} が一緒になって、イミン結合を形成する化合物の合成法を示す。

[化 118]



[0275] N_1工程～N_8工程

N_1工程はB法のB_9工程、N_2工程はA法A_7工程、N_3工程はA法A_8工程、N_4工程はA法A_2工程、N_5工程はA法A_10工程、N_6工程はA法A_11工程、N_7工程はE法E_1工程、N_8工程はE法E_1工程に従って製造される

[0276] (R¹³)' = R¹³の場合、以下のN_9工程およびN_10工程に従い製造する。

[0277] N—9工程

N₉工程は、A法A₇工程に従って製造される。

[0278] N—10工程

PRO⁴とPRO⁸が同じ保護基の場合、E法E₄工程に従って製造される。PRO⁴とPRO⁸が異なる保護基の場合、E法E₅およびE₆工程に従って製造される。

[0279] (Ri3) , が保護基をもつ場合、以下のN₁₁工程およびN₁₂工程に従い製造する。

[0280] N—11工程

B法B—3工程に従って製造される。

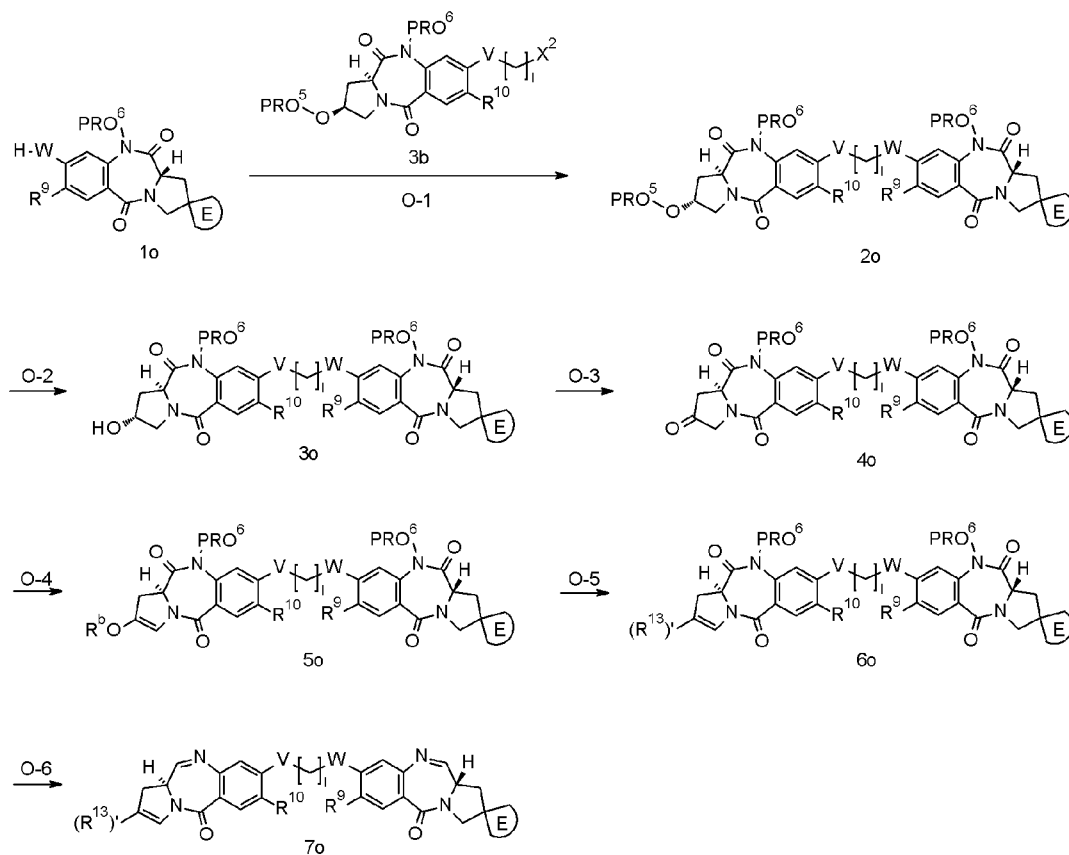
[0281] N—12工程

PRO⁴とPRO⁸が同じ保護基の場合、E法E₃およびE₄工程に従って製造される。PRO⁴とPRO⁸が異なる保護基の場合、E法E₃、E₅およびE₆工程に従って製造される。

[0282] 0法

0法は、(1)で示される遊離薬物のうち、R¹¹とR¹²が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、R¹⁴とR¹⁵およびR¹⁶とR¹⁷が一緒になって、イミン結合(C=N)である化合物(6o)を製造する方法である。

[化119]



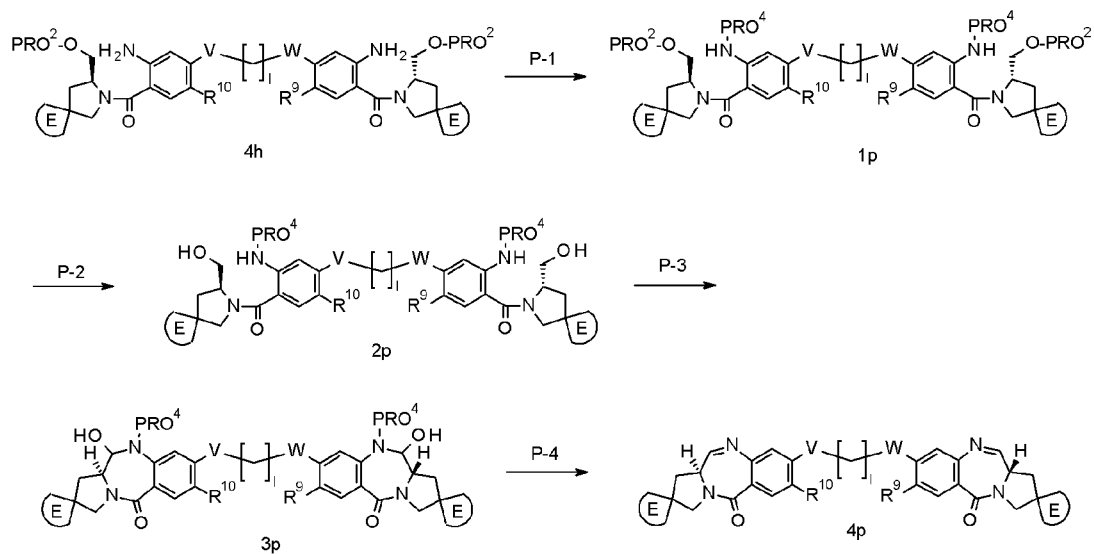
[0283] 0_1工程～0_6工程

0_1工程はE法E_1工程、0_2工程はB法B_3工程、0_3工程はA法のA_8工程、0_4工程はB法のB_5工程、0_5工程はB法のB_6工程、0_6工程はB法B_7工程に従って製造される。

[0284] P法

本製造法は (1) で示される遊離薬剤のうち、R¹¹が水素原子を示し、R¹²及びR¹³は一緒になってスピロ環を形成し、R¹⁴とR¹⁵およびR¹⁶とR¹⁷が一緒になって、イミン結合 (C = N) である化合物を製造する方法である。本製造法において、出発原料である化合物 (4h) で表されるR¹²及びR¹³で形成するスピロ環はEと同義であるため、表記もEで示す。

[化 120]



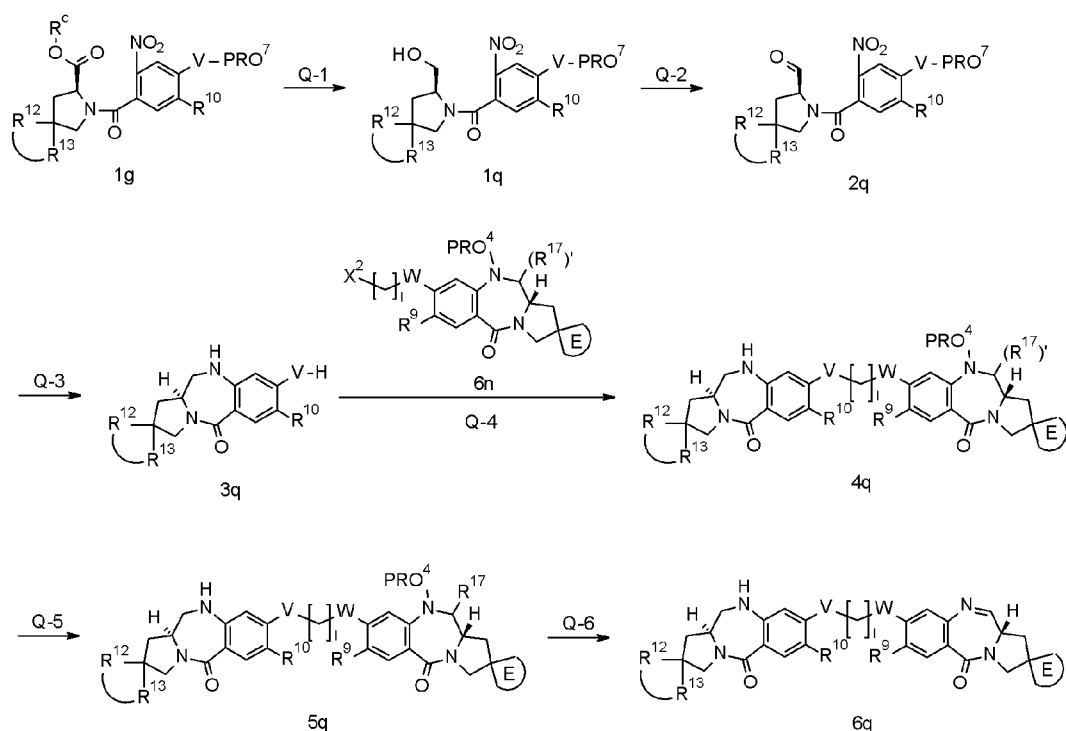
[0285] P- 1工程～P- 4工程

P_ 1工程はB法のB_9 工程、P_ 2工程はB法B_ 3工程、P_ 3工程はA法A_ 8工程、P—4工程はC法C—6工程に従って製造される。

[0286] Q法

本製造法は (1) で示される遊離薬剤のうち、R¹¹、R¹⁴とR¹⁵が水素原子を示し、R¹²及びR¹³は一緒になってスピロ環を形成し、およびR¹⁶とR¹⁷が一緒になって、イミン結合 (C=N) である化合物を製造する方法である。

[化 12 1]



[0287] Q_1工程～Q_6 工程

Q_1工程はA法の六_1工程、Q_2工程はA法A_8工程、Q_3工程はA法A_5工程、Q_4工程はE法E_1工程、Q_5工程はA法A_7工程、Q_6工程はC法C_6工程に従って製造される。

[0288] 上記において、保護されてもよい、アミノ基、ヒドロキシ基保護基とは、加水素分解、加水分解、電気分解、光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基をいい、有機合成化学で一般的に用いられる保護基を示す（例えば、Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc. (1999年) 参照）。

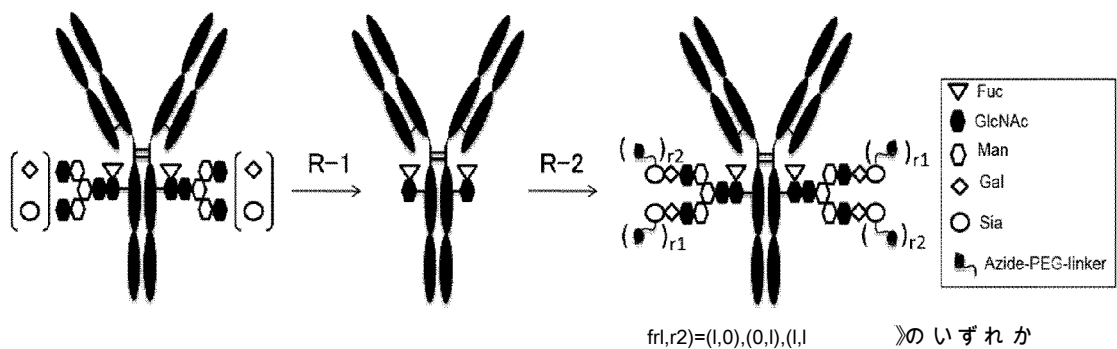
上記において、保護されてもよいヒドロキシ基の「保護基」（例えば、アルキルカルボニル基、シリル基又はアラルキル基）、保護されてもよいカルボキシ基の「保護基」（例えば、 C_1-C_8 アルキル基又はアラルキル基）、保護されてもよいアミノ基の「保護基」（例えば、アルコキシカルボニル基）は、有機合成化学の分野で使用されるヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基の保護基であれば特に限定はされない。

保護・脱保護が必要な工程は、既知の方法（例えば、“Protective Groups in Organic Synthesis”（Theodore W. Greene、Peter G. M. Wuts 著、1999年、Wiley-Interscience Publication発行）等に記載の方法）に準じて行われる。

[0289] R法：抗体の調製

糖鎖リモデリング抗体、例えばWO2013/120066などに記載の方法に準じて、図3に示すような方法で製造することができる。

[化122]



[0290] R₁工程 還元末端のキトピオース構造のGlcNAc β1-4GlcNAcの間のグリコシド結合の加水分解

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

目的の抗体（20mg/mL）を緩衝溶液（50mMリン酸緩衝溶液等）中、0℃から40℃までにおいて、EndoS酵素等の加水分解酵素を用いて還元末端のキトピオース構造のGlcNAc β1と4GlcNAcの間のグリコシド結合の加水分解反応を実施する。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。野生型EndoS酵素は抗体100mgに対して、0.1から10mg、好ましくは0.1から3mgを用いる。反応終了後、後述するアフィニティークロマトグラフィー精製及び/又はハイドロキシアパタイトカラム精製を実施することでGlcNAc β1と4GlcNAcの間の糖鎖が加水分解された（Fuc α1,6）GlcNAc抗体を製造することができる。

[0291] R-2工程 糖鎖転移反応

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

上記の糖鎖切断抗体を緩衝溶液 (リン酸緩衝溶液等) 中、0℃から40℃までにおいて、触媒量のEndoS (D233O/O303L) 等の糖転移酵素存在下、アジド糖鎖オキサゾリン体と反応させることで、糖鎖転移反応を実施する。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。EndoS酵素 (D2330/0303い) は抗体100mgに対して、1から10mg、好ましくは1から3mgを用い、アジド糖鎖オキサゾリン体は2から過剰当量、好ましくは2から20当量を使用する。

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

アジド糖鎖オキサゾリン体は実施例55〜57に記載の方法に従い調製できる。MSG (MSG1、MSG2) 又はジシアロオクタサッカリド (東京化成工業 (株)) に有機合成科学分野で公知の反応 (縮合反応等) を利用して、アジド基を含むPEGリンカー (N_3 -L(PEG)) である N_3 -(CH₂CH₂-O)_n-CH₂CH₂-NH₂を導入することができる。すなわち、シアル酸2位へのカルボン酸と N_3 -(CH₂CH₂-O)_n-CH₂CH₂-NH₂の右末端のアミノ基が縮合反応によりアミド結合を形成する。

縮合反応を用いる場合、縮合剤としては、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDCI)、カルボニルジイミダゾール (CDI)、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル) フエノール (BOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩 (PyBOP)、0-(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リン

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

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

なお、MSG、MSG1又はMSG2は、前記 (MSG-) Asn 又は分離精製した (MSG1-) Asn もしくは (MSG2-) Asn (実施例 56) を EndoM 等の加水分解酵素で加水分解することにより得ることができる。

オキサゾリン化はMSG (MSG1、MSG2) 又はSG型糖鎖の還元末端のGlcNAcから、公知の論文 (J. Org. Chem., 2009, 74 (5), 2210-2212; Helv. Chim. Acta, 2012, 95, 1928-1936.) に従い調製できる。

[0292] 上記の糖鎖リモデリング抗体の調製において、抗体水溶液の濃縮、濃度測定、バッファー交換は以下の共通操作A乃至Cに従って行うことができる。

共通操作A: 抗体水溶液の濃縮

Amicon Ultra (30,000乃至50,000 MWCO, Millipore Co.) の容器内に抗体又は抗体-薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機 (AはEgrea X-15R, Beckman Coulter, Inc.) を用いた遠心操作 (2000G乃至4000Gで5乃至20分間遠心) にて、抗体および後述する抗体-薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

共通操作B: 抗体の濃度測定

UV測定器 (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる280nm吸光係数 ($1.3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 乃至 $1.8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いた。

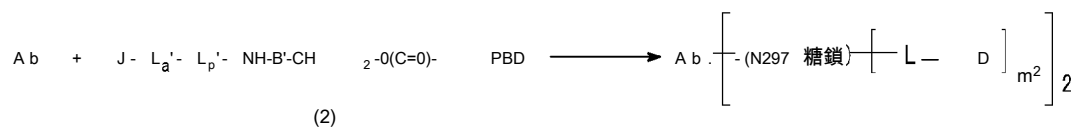
共通操作C: 抗体のバッファー交換

抗体水溶液は緩衝溶液（リン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）、リン酸緩衝液（pH6.0）等）を加え共通操作Aを用いて濃縮した。この操作を数回行った後、共通操作Bを用いて抗体濃度の測定を行い、緩衝溶液（リン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）、リン酸緩衝液（pH6.0）等）を用いて10mg/mLに抗体濃度を調整した。

[0293] S法：コンジュゲーション

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

[化123]



抗体Abの緩衝溶液（酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム溶液等またはそれらの混合物）と、化合物（2）を適当な溶媒（ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMA）、N-メチル-2-ピリドン（NMP）、プロピレングリコール（PG）等またはそれらの混合物）に溶解させた溶液を混合することで、SPAAC反応は進行する。

抗体1モルに対し、化合物（2）は2モルから過剰モル、好ましくは1モルから30モルであり、有機溶媒の比率は、抗体の緩衝液に対し1乃至200%v/vが好ましい。反応温度は0℃乃至37℃、好ましくは10℃から25℃であり、反応時間は1から150時間、好ましくは6時間から100時間である。反応時のpHは5乃至9が好ましい。

[0294] 抗体—薬物コンジュゲートは、前述の共通操作A乃至Cおよび後述の共通操作D乃至Fによってバッファー交換、精製、抗体濃度、及び抗体—分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体—薬物コンジュゲート化合物（ADC）の

同定を行うことができる。

[0295] 共通操作D :抗体－薬物コンジュゲートの精製

市販の Sorbitol (5%) を含む酢酸緩衝液 (10mM, pH5.5 ; 本明細書でABSと称する) のいずれかの緩衝液でNAP-25カラムを平衡化させた。このNAP-25カラムに、抗体－薬物コンジュゲート反応水溶液 (約1.5～2.5mL) をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びNAP-25カラムにのせ、緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計2乃至3回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーやジメチルスルホキシド、プロピレングリコールを除いた抗体－薬物コンジュゲートを得た。必要に応じて、共通操作AおよびCにより抗体－薬物コンジュゲート溶液の濃度を調製した。

共通操作E :抗体－薬物コンジュゲートにおける抗体濃度の測定

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

以下にランバルト・ベールの法則を用いた式 (I) を示す。

[数 1]

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

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

上記式 (I) より抗体－薬物コンジュゲートのモル濃度 C (mol/L) は以下の式 (II) で求められる。

[数 2]

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

さらに両辺に抗体－薬物コンジュゲートのモル質量 MW (g/mol) を掛けるこ

とで、抗体—薬物コンジュゲートの重量濃度 C' ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) を求めることができる (式 (III))。

[数3]

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

以下に、上記式に用いて本実施例に適用した各値について記載する。

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

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

[数4]

$$\epsilon_{280} = \epsilon_{\text{Ab}, 280} + \epsilon_{\text{DL}, 280} \cdot \chi \quad \text{式(IV)}$$

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

$\epsilon_{\text{Ab}, 280}$ は抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法 (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) によって推定することができる。実施例において、Trastuzumab のモル吸光係数は、 $\epsilon_{\text{Ab}, 280} = 215400$ (計算推定値) を用いた。CLDN6抗体のモル吸光係数は、 $\epsilon_{\text{Ab}, 280} = 221340$ (計算推定値)、TR0P2抗体のモル吸光係数は、 $\epsilon_{\text{Ab}, 280} = 226400$ (計算推定値)、CD98抗体のモル吸光係数は、 $\epsilon_{\text{Ab}, 280} = 240400$ (計算推定値)、LPS抗体のモル吸光係数は、 $\epsilon_{\text{Ab}, 280} = 230300$ (計算推定値) を、Trastuzumab 変異体のモル吸光係数は、 $\epsilon_{\text{Ab}, 280} = 215057$ (計算推定値) を用いた。

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

値を使用した。

[0296] 共通操作 F :抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体—分子あたりの薬物平均結合数の測定

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

[F- 1. HPLC 分析用サンプルの調製 (抗体—薬物コンジュゲートの還元)]

抗体—薬物コンジュゲート溶液 (約 1mg/ml、 $60\mu\text{L}$) をジチオトレイトール (DTT) 水溶液 (100mM、 $15\mu\text{L}$) と混合する。混合物を 37°C で 30 分インキュベートすることで、抗体—薬物コンジュゲートの L 鎖及び H 鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、HPLC 分析に用いる。

[F- 2. HPLC 分析]

HPLC 分析を、下記の測定条件にて行う。

HPLC システム :Agilent 1290 HPLC システム (Agilent Technologies)

検出器 :紫外吸光度計 (測定波長 :280nm、329nm)

カラム :BEH Phenyl (2.1 X 50mm、 $1.7\mu\text{m}$ 、Waters Acquity)

カラム温度 : 75°C

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

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

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

サンプル注入量 : $5\mu\text{L}$

[0297] [F- 3. データ解析]

[F- 3- 1] 薬物の結合していない抗体の L 鎖 (L_0) 及び H 鎖 (H_0) に対して、薬物の結合した L 鎖 (薬物が一つ結合した L 鎖 : L_1)、及び H 鎖 (薬物が一つ結合した H 鎖 : H_1 、薬物が二つ結合した H 鎖 : H_2 、薬物が三つ結合した H 鎖 : H_3) は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大き

なることから、 L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 の順に溶出される。し、 H_0 の順序は前後する場合があるが、薬物が結合していない H_0 は、薬物に特長的な329nmの波長吸収が無い。よって329nmの波長吸収を確認することで、し、 H_0 を判別することができる。 L_0 及び H_0 との保持時間比較により検出ピークを L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 のいずれかに割り当てることができる。

(F-3-2) 薬物リンカーにUV吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、L鎖、H鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

[数5]

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

ここで、各抗体におけるL鎖及びH鎖のモル吸光係数(280nm)は、既知の計算方法(Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423)によって、各抗体のL鎖及びH鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。Trastuzumabの場合、そのアミノ酸配列に従って、L鎖のモル吸光係数として26150を、H鎖のモル吸光係数として81290を推定値として用いた。同様に、CLDN6抗体の場合、L鎖のモル吸光係数として33140を、H鎖のモル吸光係数として77280を、TR0P2抗体の場合、L鎖のモル吸光係数として26210を、H鎖のモル吸光係数として68990を、CD98抗体の場合、L鎖のモル吸光係数として41680を、H鎖のモル吸光係数として78500を、LPS抗体の場合、L鎖のモル吸光係数として31710を、H鎖のモル吸光係数として77470を、Trastuzumab変異体の場合、また、L鎖のモル吸光係数として26251を、H鎖のモル吸光係数として81488を、薬物リンカーのモル吸光係数(280nm)は、コンジュゲート前駆体である化合物(1)の実測のモル吸光係数(280nm)を用いた。

(F-3-3) ピーク面積補正值合計に対する各鎖ピーク面積比(%)を下式に従って計算する。

[数6]

$$L \text{ 鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{w0} + A_{L1}} \times 100$$

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

A_{w0}, A_{Hi} : L_i, H_i 各々のピーク面積補正值

(式 3-4) 抗体—薬物コンジュゲートにおける抗体—分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算する。

$$\text{薬物平均結合数} = \frac{(L_{00} \text{ピーク面積比} \times 0 + L_{01} \text{ピーク面積比} \times 1 + H_{00} \text{ピーク面積比} \times 0 + H_{01} \text{ピーク面積比} \times 1 + H_{02} \text{ピーク面積比} \times 2 + H_{03} \text{ピーク面積比} \times 3)}{100 \times 2}$$

[0298] < 医薬 >

本発明の抗体—薬物コンジュゲートは、癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことから、医薬として、特に癌に対する治療剤及び/又は予防剤として使用することができる。

[0299] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートが適用される癌の種類としては、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌等）、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍等）、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、食道癌等、子宮体癌、精巣癌（セミノーマ、非セミノーマ）、子宮頸癌、胎盤絨毛癌、多形神経膠芽腫、脳腫瘍、頭頸部癌ならびにそれらの転移性形態等を挙げることができるが、治療対象となる癌細胞において抗体—薬物コンジュゲート中の抗体が認識できる蛋白質を発現している癌細胞であればこれらには限定されることはない。

[0300] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、より好ましくはヒトである。

[0301] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用

される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。

[0302] 本発明の抗体—薬物コンジュゲートは、1種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、1種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水および油（石油、動物、植物、または合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など）を含む））を含む。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。その処方は、投与の態様に対応する。

[0303] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗体—薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入またはボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記リガンド薬物結合体の投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。

[0304] 代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、（例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水の濃縮物として、別個に、または単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬が注入によって投与される予定である場合、それは、例えば、滅菌の製薬グ

レー ドの水または食塩水を含む注入ボ トルで投薬され得る。上記医薬が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。

[0305] 本発明の医薬組成物には本願の抗体－薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であつてもよいし、抗体－薬物コンジュゲート及び少なくとも一つのこれ以外の癌治療剤を含む医薬組成物であつてもよい。本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、他の癌治療剤と共に投与することもでき、これによつて抗癌効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗癌剤は、抗体－薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このような癌治療剤として、abraxane、carboplat in、cisplat in、gemcitab ine、irinotecan(CPT-11)、paclitaxe l、pemet rexed、soraf enib、vinbLast in又はWO2003/038043 号パンフレットに記載の薬剤、更にLH—RHアナログ（リユープロレリン、ゴセレリン等）、エストラムスチン・フォスフェイト、エストロジェン拮抗薬（タモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。

[0306] このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であつてもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

[0307] 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によつても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗体－薬物コンジュゲートは、抗体－薬物コンジュゲートの抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数（ K_d 値）の点において、親和性が高い（ K_d 値が低い）ほど、少量の投与量であつても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体－薬物コンジュゲートの投与量の

決定に当たっては、抗体－薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体－薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約0.001～100mg/kgを1回あるいは1～180日間に1回の間隔で複数回投与すればよい。

[0308] また、本発明の抗体又は該抗体の機能性断片もまた、医薬として使用することができる。この場合、上述の<医薬>に関する「抗体－薬物コンジュゲート」に関する記載を、適宜「抗体又は該抗体の機能性断片」に関する記載であると読み替えることができる。

[0309] さらに、本発明の遊離薬物（新規PBD誘導体化合物）、その塩、又はそれらの水和物もまた、医薬として使用することができる。この場合、上述の<医薬>に関する「抗体－薬物コンジュゲート」に関する記載を、適宜「遊離薬物（新規PBD誘導体化合物）、その塩、又はそれらの水和物」に関する記載であると読み替えることができる。

実施例

[0310] 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。

[0311] 参考例1: Trastuzumab – Tesirine

工程1: 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

Trastuzumab（参考例3）の5mM四酢酸エチレンジアミン－リン酸緩衝生理食塩水（pH6.5）溶液（9.91mg/mL、0.70mL）に、20℃にてリン酸ニカリウム水溶液（1.0M、0.0112mL）、トリス（2－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩水溶液（10mM、0.0086mL）を加え、20℃にて60分間、室温で30分間反応させた。反応溶液に文献（Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983 - 987）を参考にして合成したTesirine（0.36mg）のジメチルアセトアミド溶液（0.0415mL）を加え、室温で1時間反応させた。反応溶液にN－アセチルシステイン水溶液（100mM、0.0024mL）を加え、30分間反応させて反応を停止した。

精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を3.5mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.40mg/mL , 抗体収量 : 4.90mg (71%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 2.0

[03 12] 参考例2 : 抗 CLDN6 (H1L1) -Tessirine

工程1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

抗 CLDN6 (H1L1) 抗体の5mM四酢酸エチレンジアミン-リン酸緩衝生理食塩水 (pH6.5) 溶液 (9.87mg/mL , 0.45mL) に、20℃にてリン酸ニカリウム水溶液 (1.0M, 0.0072mL) 、 トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩水溶液 (10mM, 0.0041 mL) を加え、20℃にて90分間反応させた。反応溶液に文献 (Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987) を参考に合成したTessirine (0.15mg) のN、N-ジメチルアセトアミド溶液 (0.0277mL) を加え、20度で1時間反応させた。反応溶液にN-アセチルシステイン水溶液 (100mM、0.001mL) を加え、30分間反応させて反応を停止した。

精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を3.5mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.56mg/mL , 抗体収量 : 3.90mg (88%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 2.1

[03 13] 参考例3 : 抗 HER2 抗体 Trastuzumab

抗 HER2 抗体はUS582 1337 を参照して作製した。Trastuzumab の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を配列番号64及び配列番号65に示した。

[03 14] 参考例4 : 抗 LPS 抗体 h# 1G5 - H1L1

抗 LPS 抗体はWO2015/046505 を参照して作製した。h# 1G5 - H1L1の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を配列番号66及び配列番号67に示した。

[03 15] 参考例5 : 抗 TR0P2 抗体 hRS7

抗 TR0P2 抗体はWO2003/074566 、 WO2015/098099 (参考例1) を参照して作製

した。hRS7 の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を配列番号68及び配列番号69に示した。

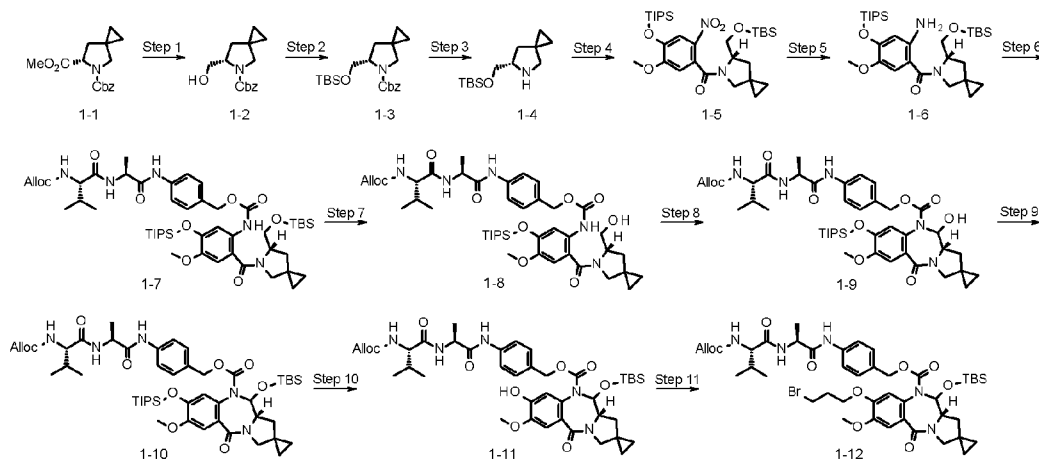
[03 16] 参考例6 :抗CD98 抗体 hM23 _ H1L1

抗CD98 抗体はWO2015/146132を参照して作製した。hM23 _ H1L1の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を配列番号70及び配列番号71に示した。

[03 17] 製造中間体の合成]

実施例1 : 中間体1

[化124]



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

5_ ベンジル 6_ メチル (6S) _ 5_ アザスピロ [2. 4] ヘプタン _ 5 , 6 _ ジカルボキシレート (104mmol, WO2012087596) のTHF (500ml) 溶液に、水素化ホウ素リチウム (4. 30g , 178mmol) を0℃にて少量ずつ加えた。0℃にて30分撹拌した後、室温にて2時間撹拌した。0℃にて水 (180ml) 、2規定塩酸 (186ml) を加え、減圧留去した。得られた残渣を酢酸エチルで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣 (27. 9g , 90%) をそのまま次の反応に用いた。

[03 18] 工程2 : ベンジル (6S) - 6- ({ [tert_ プチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) _ 5_ アザスピロ [2. 4] ヘプタン _ 5_ カルボキシレート

上記工程1にて得られた化合物 (27. 9g , 107mmol) とイミダゾール (14. 5

214mmol) ジクロロメタン (300mL) 溶 室温に e フ レシメ
チルシリルクオリ (24 2 mm 温 間 覚 し

反応溶液を飽和クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩
水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残
渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=100：0
5 的 32 5 81%) を得て

¹H-NMR (CDCl₃) 14 (s), -2 (1 -1 (1m), 2 (4 m), 5(4

MS(APCI)m/z:376(M+H)⁺

[0319] 工程3： (6S) -6- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチ
ル 5 アザスピロ 2 ヘプタン
上 言 程2で 合 5 (1) の タ 1 0mL)

溶液に、室温にて7. 5%パラジウム炭素触媒 (54%水分、5. 00g) を加え、
室温、水素雰囲気下にて6時間撹拌した。反応溶液をセライト濾過し、濾液を
減圧留去し、目的物 (21. 3g, 定量的) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 3. 79-3. 77(1H, m), 3. 71-3. 69(1H, m), 3. 65-3. 60(1H, m), 3. 01-2
2 -1. 7 (2H 5 (4 7(3H, s).

212(N

[0320] 工程4： [(6S) -6- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メ
チル 5 アザピロ 2. フ 1 5 キシ 2
ロ-4- { [トリ (プロピル-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) メタノ

5-メトキシ-2-ニトロ-4- {トリ (プロピル-2-イル) シリル] オキ
シ} 安息香酸 (52. 2g, 141mmol, US20150283262) と1-ヒドロキシベンゾト
リアゾール-水合物 (23. 8g, 155mmol) のジクロロメタン (500mL) 溶液に
、氷 下 こ ジシクコ キシリカリ ジイミ 5 mm

を加えた。反応混合物を室温にて攪拌した。カルボン酸消失後、 -60°C にて上記工程3にて得られた化合物とチルアミン (212mmol ジタン 0mL) 溶液をゆつと滴下した。反応溶液を室温にて一晩攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、反応混合物をクロロホルムで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧留去して得られた残渣に酢酸エチルとジエチルエーテルを加え、固体成分を濾過により取り除き、濾液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=100：0 (v/v) ~25：75 (v/v)] にて精製し、目的物 (55.0g, 66%) を得た。

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

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

0321 工程5: (2-アミノ-5-メトキシ-4-{[トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル) [(6S)-6-{([tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ)メチル}-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]メタノン

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

3(6H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 563(M+H)⁺

[0322] 工程6: N-[(プロポ₂-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-[4-({ [(2- { [(6S)-6-({ [tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}メチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシ-5-{ [トリ(プロパン₂-イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]-L-アラニンアミド

上記工程5で得られた化合物 (18.6g, 33.0mmol) および トリエチルアミン (6.26mL, 45.2mmol) の THF (300mL) 溶液に、エタノール-氷浴上にて、トリホスゲン (4.22g, 14.2mmol) をゆっくりと添加した。添加後、氷冷した反応混合物に、N-[(プロポ₂-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]-L-アラニンアミド (11.4g, 30.2mmol, WO2011130598) と トリエチルアミン (6.26mL, 45.2mmol) の THF (100mL)、N,N-ジメチルホルムアミド (30mL) 混合溶液をゆっくりと滴下した。滴下後、氷浴をはずし、反応混合物を、窒素雰囲気下、40℃にて攪拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィ- [ヘキサン:酢酸エチル = 100:0 (v/v) → 40:60 (v/v)] にて精製し、目的物 (23.5g, 74%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.99(1H, m), 8.58(1H, s), 7.80(1H, s), 7.55-7.53(2H, m), 7.34-7.32(2H, m), 6.77-6.75(2H, m), 5.94-5.87(1H, m), 5.40-5.38(1H, m), 5.33-5.29(1H, m), 5.23-5.21(1H, m), 5.13(1H, m), 5.10(2H, m), 4.69-4.64(1H, m), 4.62-4.52(2H, m), 4.06-4.03(1H, m), 3.98(1H, m), 3.76-3.65(6H, m), 3.04(1H, m), 2.28-2.26(1H, m), 2.18-2.13(1H, m), 1.46(3H, m), 1.32-1.25(3H, m), 1.11-1.09(1.8H, m), 0.99-0.84(1.5H, m), 0.65-0.40(4H, m), 0.08-0.00(6H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 966(M+H)⁺

[0323] 工程7: N-[(プロポ₂-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル

-N- [4- ({ [(2- { [(6S) -6- (ヒロキシメチル) -5-アザスピロ
 ロ [2, 4] ヘフト-5-イル] カルボニル} -4-メトキシ-5- { [トリ (フ
 ロロ)-2-イル] シリル] オキシ} フエニル] カルバモイル] オキシ} メチ
 ル) フエニル] -1-アミニル]

上記工程6で得られた化合物 (23, 5g, 24, 3mmol) のTHF (50mL) , メタノール (50mL) , 水 (44mL) 溶液に、室温下に酢酸 (200mL) を加えた。反応混合物を室温にて攪拌した。原料消失後、反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサシ : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) ~ 0 : 100 (v/v)] にて精製

し、目的物（18.09, 87%）を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.64-8.62(1H, m), 8.50(1H, m), 7.69(1H, m), 7.55-7.53(2H, m), 7.34-7.32(2H, m), 6.79-6.75(3H, m), 5.91-5.89(1H, m), 5.32-5.29(1H, m), 5.23-5.21(1H, m), 4.68-4.54(4H, m), 4.31(1H, m), 4.06-4.04(1H, m), 3.81-3.79(3H, m), 3.76(3H, s), 3.63-3.61(1H, m), 3.13-3.11(1H, m), 2.16-2.13(1H, m), 1.87-1.81(2H, m), 1.46-1.43(3H, m), 1.30-1.24(3H, m), 1.12-1.08(18H, m), 0.98-0.91(6H, m), 0.63-0.45(4H, m).

MS(APCI, ESI) m/z: 852(M+H)⁺

[0324] 工程8: N- [(ジロゾ-2-エソ-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バニル-N- {4- [({ [(11a) S] -11' -ロトロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-8' - } [トリ (ジロゾ-2-イル) シリル] オキシ} -11' , 11a' -ジトロ-1' H-スロ [シクロゾロパソ-1, 2' -ロロ [2, 1-c] ベンゾゾアゼレン] , , 1' カルニル オキシ

チル フェル	チル スル キシ	75 L,	ジクロロメタン
アラ シアミ			
溶液に	素霧 気下、	キサリル (	5 mL,
をゆ	り 下し	下後、1 応 合 を	覚 し 1 応

混合物に、上記工程7で得られた化合物 (18. 0g, 21. 1mmol) のジクロロメ

タン (50.0 mL) 溶液をゆっくりと滴下した。反応溶液に -78°C にて、トリエチルアミン (14.6 mL, 105 mmol) を加えた。添加後、冷媒浴をはずし、室温までゆっくりと昇温した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物をクロロホルム (200 mL) で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) $\rightarrow$ 0 : 60 (v/v)] にて精製し、目的物 (16.5 g, 92%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 8.51-8.36 (1 H, m), 7.54-7.38 (2H, m), 7.22-7.07 (3H, m), 6.73-6.64 (1 H, m), 5.94-5.87 (2H, m), 5.33-5.22 (3H, m), 5.09 (1 H, m), 4.97 (1 H, m), 4.64-4.58 (4H, m), 4.02-4.00 (1 H, m), 3.86-3.83 (3H, m), 3.75-3.70 (1 H, m), 3.61-3.54 (2H, m), 3.38-3.29 (1 H, m), 2.40 (1 H, m), 2.16-2.14 (1 H, m), 1.74-1.71 (1H, m), 1.44 (3H, m), 1.18-1.16 (3H, m), 1.05-1.00 (18H, m), 0.97-0.92 (6H, m), 0.72-0.60 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 850 (M+H)⁺

[0325] 工程 9: N- [(プロパン-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L- バリル-N- {4- [({ [(11a, S) -11' - { [tert -ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7' -メトキシ-5' -オキシ-8' - { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -11' , 11a' -ジヒドロ- Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

上記工程 8 で得られた化合物 (12.0 g, 14.1 mmol) および 2, 6-エルチジン (6.58 mL, 56.5 mmol) のジクロロメタン (200 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、 0°C にて、トリフルオロメチルスルホン酸 tert -ブチルジメチルシリル (9.73 mL, 42.3 mmol) をゆっくりと滴下した。氷冷下、10 分間撹拌した後に、氷浴をはずし、室温にて撹拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物をクロロホルムで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣をシリカゲル

ルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=100：0 (v/v)~25：75 (v/v)] にて精製し、目的物 (8.12g, 60%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.67-8.45(1H, m), 7.50-7.44(2H, m), 7.19(1H, s), 7.13(2H, m), 6.95(2H, m), 6.62-6.57(2H, m), 6.01(1H, m), 5.95-5.86(1H, m), 5.33-5.13(3H, m), 4.82(1H, m), 4.65-4.54(3H, m), 4.03-4.01(1H, m), 3.84-3.82(3H, m), 3.73-3.66(1H, m), 3.50-3.48(1H, m), 3.27(1H, m), 2.37-2.33(1H, m), 2.19-2.13(1H, m), 1.54-1.43(3H, m), 1.22-1.13(3H, m), 1.10-1.00(18H, m), 0.97-0.91(6H, m), 0.81(9H, s), 0.76-0.59(4H, m), 0.19--0.09(6H, m).

MS(APCI, ESI)⁺m/z: 964(M+H)⁺

[0326] 工程10: N- [(プロゾ-2-エノ-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バシリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -8' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンミド

上記工程9で得られた化合物 (8.12g, 8.42mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (90mL) と水 (2mL) 溶液に、酢酸リチウム (0.611g, 9.26mmol) を加え、室温下で撹拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=100：0 (v/v) ~0：100 (v/v)] にて精製し、目的物 5 を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.7 (1, 10-7), 8.1- (1, 2), 5.95-5.84(1H, m), 5.41-5.20(2H, m), 5.16(1H, m), 4.84(1H, m), 4.67-4.54 (4H, 4, 1, 3, 1(1H), 4.42 (12 (1H), 7-0. (4

$$+(H+I^{3/4})808 : Z / III (IS3 \quad , I3dV)SI^{3/4}$$

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100)

1r -N- {4 - - [[(([[11a, S) 8. - (f-7-□ i 7-□□□□□ (シ) - 11-

$$F = \{ \text{シキフ} [\text{リリシ} (\text{リフ} \times \text{シ}) \text{リフ} - \text{リリ}] \}$$
[illegible]

□ □ [2, 1 - c] [1, 4] $\Psi \Psi \Psi \Psi$ [- 10' (6) H) - r y] ¥ l 示

$$\mathcal{A} \equiv \mathcal{A} \vee = \subseteq \mathcal{A} \perp \quad \{ \mathcal{A} = \perp \} \vee \{ \mathcal{A} \neq \perp \} \{ \mathcal{A} =$$
[illegible]

回對 34%、子丹、目 34%、(Z, 73g, 99% 得た。

$\varepsilon_{\text{H}} = \phi(\text{Hz}) / T_9 \cdot L_{-79} (\text{W}/\text{Hz}) / T_{70} \cdot 8^{-T_Z/8} (\text{W}/\text{Hz})^{98/6 - L_0/0.1 : 9} (^{\circ}\text{A}-0.01/\%)$ 扇 N_{HI}

[illegible][illegible]

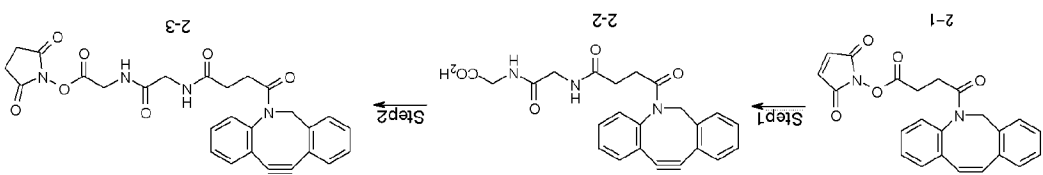
0 (s 'H6)6 8 "0 'ϕ 'H6)£9 "0-68 '0 '(w 'H7)0£ 'l-77'l '(w 'H l) 76 ' 8 6 'l '(w 'H 7) 60

"(l" 'H9)90 , 0-£ l "

ES (SI) m/z: 930 [81 Br, +], 928 [86 Br, + (H+)]

[0328] 实施例2：中間体2

[9717]



(H9) 5- 77 [f b] 77 77 77 77 77 77 - 77, 11, -17 N : ほ も工

[illegible]

へ ミレリ_E 1し_口 ぶ 人んく、 N 'N 、 (10_国 67マ'68な'0) /:/イ 1_イリ_イ |_イ

17]- l , = 1 吻 号 % @ (7 « 0 v) t = 厶 マ 1 i び 1 j ≠ z . i - N' N? (1 ○ 圖 6 9 マ , 7 m E 3 b ' 0)

-(11, 12-21, 11).

1) 75% 2) 50% 3) 25% 4) 10% 5) 5% 6) 2% 7) 1% 8) 0.5% 9) 0.2% 10) 0.1% 11) 0.05% 12) 0.02% 13) 0.01% 14) 0.005% 15) 0.002% 16) 0.001% 17) 0.0005% 18) 0.0002% 19) 0.0001% 20) 0.00005% 21) 0.00002% 22) 0.00001% 23) 0.000005% 24) 0.000002% 25) 0.000001%

＊ (10L) を室温に 1 加え、室温に 1 晩攪拌してマ。減圧蒸着して、

得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : CMW = 100 : 0(v/v) ~ 0 : 100(v/v)] にて精製し、目的物 (0.930g, 89%) を得た。

CMW とは、クロロホルム : メタノール : 水 = 7 : 3 : 1(v/v/v) の分配有機層
¹H-NMR(CDMSO-D₆) δ : 12.58(1 H, s), 8.14-8.12(1 H, m), 8.08-8.07(1 H, m), 7.69-7.68(1 H, m), 7.62-7.61(1 H, m), 7.53-7.45(3H, m), 7.40-7.29(3H, m), 5.05-5.01(1 H, m), 3.73-3.72(2H, m), 3.66-3.60(3H, m), 2.66-2.60(1 H, m), 2.33-2.24(1 H, m), 2.08-2.04(1 H, m), 1.81-1.77(1 H, m) .

MS(APCI、ESI)m/z : 420 [(M+H)⁺] .

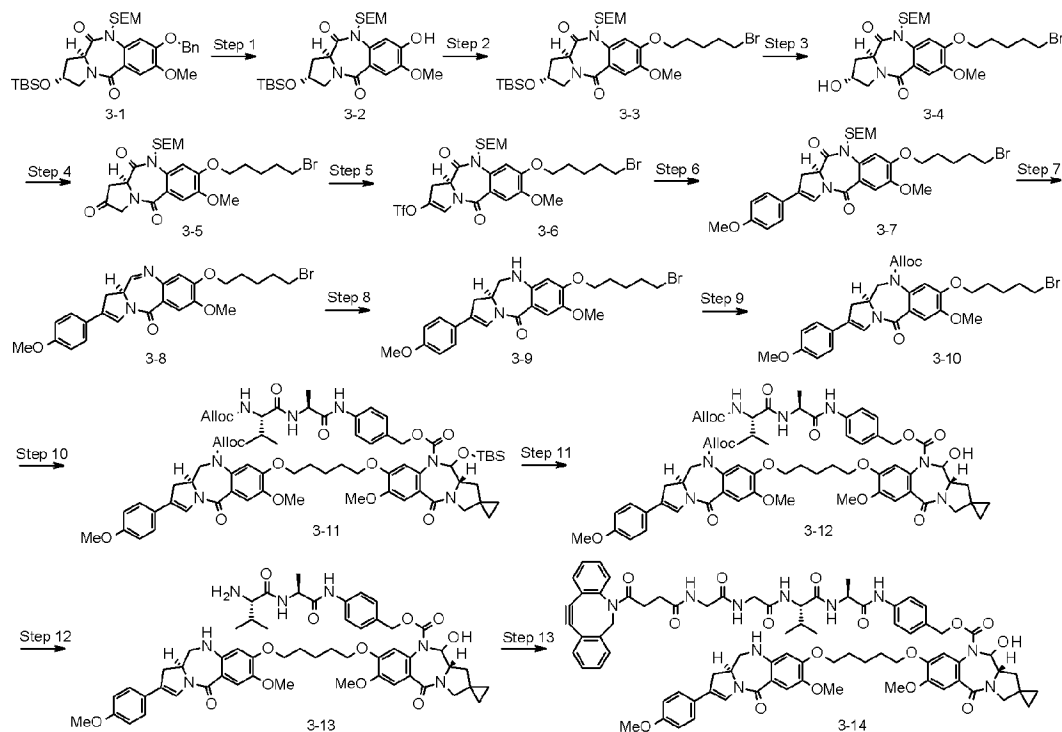
[0329] 工程 2 : 2, 5- ジオキソピロリジン—1—イル N-[4- (11, 12- ジデヒドロジベンゾ[b, f] アゾシン-5(6H)-イル) -4- オキソプタノイル] グリシルグリシネート

上記工程 1 にて得られた化合物 (0.612g, 1.46mmol) 、N—ヒドロキシスクシイミド (0.168g, 1.459mmol) のジクロロメタン (6mL) 溶液に、1_エチル_3_ (3—ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (0.420g, 2.19mmol) を加え、室温で 21 時間撹拌した。減圧留去し、得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : CMW = 100 : 0(v/v) ~ 0 : 100(v/v)] にて精製し、目的物 (0.375g, 50%) を得た。

CMW とは、クロロホルム : メタノール : 水 = 7 : 3 : 1(v/v/v) の分配有機層

[0330] 実施例 3 : 薬物リンカー 1

[化 126]



工程 1 : (2R, 11aS) - 2- { [tert_ プチル (ジメチル) シリル] オキシ }
 _ 8-ヒドロキシ-7-メトキシ-10- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ]
] メチル } - 2, 3-ジヒドロ_1H_ピロロ [2, 1- c] [1, 4] ベンゾジアゼ
 ピン-5, 11 (10H, 11aH) -ジオン

(2R, 11aS) - 8- (ベンジルオキシ) _ 2_ { [tert_ プチル (ジメチル)
] シリル] オキシ } _ 7-メトキシ-10_ { [2- (トリメチルシリル) エト
 キシ] メチル } - 2, 3-ジヒドロ_1H_ピロロ [2, 1- c] [1, 4] ベンゾジ
 アゼピン_ 5, 11 (10H, 11aH) -ジオン (25. 5g, 41. 6 mmol, WO2016149546
) の THF (150ml) 、 エタノール (150ml) 溶液に、窒素雰囲気下、5% パラジ
 ウム炭素 (54%水分、10. 0g) を加えた後、反応溶液を水素雰囲気下、室温
 にて三日間撹拌した。反応溶液にクロロホルムを加え、セライト濾過した後
 、濾液を減圧留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフ
 イー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) → 50 : 50 (v/v)] にて精製
 し、目的物 (19. 4g, 89%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.36 (1H, s) , 7.25 (1H, s) , 6.01 (1H, s) , 5.45-5.43 (1H, m) , 4.69-

4. (1H m), 4. 4.5 m), 4.23-4.21(1H

61(1H 1), 1), -2 (1H 1,

7(1

MS(APCI, ESI)m/z:523(M+H)⁺

[1 程2 (2R, 11 (ジメチル) オキシ

ーブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7-メトキシ-10- { [2- (トリ

メチルシリル) エトキシ] メチル} -2, 3-ジヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c

] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5, 11 (10H, 11aH) -ジオン

上記工程1にて得られた化合物 (10. 8g, 20. 7mmol) のN, N-ジメチルホ

ルムファミド (30mL) 溶液に、1, 5-ジプロモペンタン (23. 8g, 103mmol)、

炭酸カリウム (3. 43g, 24. 8mmol) を室温で加えた。室温で3時間撹拌した

後、反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食

塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣

をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=90：10 (v

/v) ~50：50 (v/v)] にて精製し、目的物 (14. 5g, 定量的) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.34(1H, s), 7.21(1H, s), 5.52-5.49(1H, m), 4.63-4.62(1H, m),

4.58-4.55(1H, m), 4.24-4.22(1H, m), 4.07-4.04(2H, m), 3.92(3H, s), 3.82-3.64(

3H, m), 3.56-3.53(1H, m), 3.45-3.43(2H, m), 2.86-2.84(1H, m), 2.04-2.00(1H, m)

, 1.97-1.87(4H, m), 1.66-1.62(2H, m), 1.01-0.98(2H, m), 0.87(9H, s), 0.10(6H, s

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

[0332] 工程3: (2R, 11aS) -8- [(5-プロモペンチル) オキシ] -2-ヒドロキ

シ-7-メトキシ-10- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -2

, 3-ジヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5, 11 (

10H, 11aH) -ジオン

上記工程2にて得られた化合物 (21. 5mmol) のTHF (40mL) 溶液に、1mol/

Lのナトリウムフタレート (28. 0mL, 28. 0mmol) を0

に加え 室温 分間 攪拌 し、後、反応溶液に水を加え、酢酸 エ

ルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 97.5 : 2.5 (v/v) → 92.5 : 7.5 (v/v)] にて精製し、目的物 (1.3g, 94%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.34(1H, s), 7.21(1H, s), 5.53-5.50(1H, m), 4.69-4.64(2H, m), 4.32-4.30(1H, m), 4.10-4.00(2H, m), 3.91(3H, s), 3.88-3.75(2H, m), 3.73-3.64(2H, m), 3.45-3.44(2H, m), 2.99-2.96(1H, m), 2.15-2.09(1H, m), 1.99-1.85(5H, m), 1.68-1.62(2H, m), 1.01-0.95(2H, m), 0.04(9H, s)。

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

[0333] 工程4 : (11aS) 8-[(5-プロモペンチル)オキシ]-7-メトキシ-10-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-2,5,11(3H, 10H, 11aH)-トリオン

上記工程3にて得られた化合物 (1.3g, 20.2mmol)、テトラプチルアンモニウムプロミド (0.325g, 1.01mmol)、臭化カリウム (0.240g, 2.02mmol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (60ml)、ジクロロメタン (60ml) に溶解させ、nor-AZADO (0.0279g, 0.202mmol)、次亜塩素酸ナトリウム五水和物 (2.03g, 27.2mmol) を0℃にて加え、0℃にて30分間撹拌した。原料が残存したため、次亜塩素酸ナトリウム五水和物 (1.00g, 13.4mmol) を0℃にて加え、0℃にて15分撹拌した。さらに次亜塩素酸ナトリウム五水和物 (0.300g, 4.03mmol) を0℃にて加え、0℃にて15分撹拌し、原料の消失をTLCにて確認した。反応溶液にチオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 75 : 25(v/v) → 40 : 60(v/v)] にて精製し、目的物 (9.74g, 87%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.33(1H, s), 7.24(1H, s), 5.56-5.53(1H, m), 4.71-4.69(1H, m), 4.66-4.63(1H, m), 4.27-4.22(1H, m), 4.12-4.02(2H, m), 3.93-3.88(4H, m), 3.82-3.75(1H, m), 3.69-3.67(1H, m), 3.61-3.56(1H, m), 3.46-3.44(2H, m), 2.82-2.77(1H, m), 1.97-1.89(4H, m), 1.68-1.64(2H, m), 1.05-0.93(2H, m), 0.04(9H, s)。

C、S 557[⁸¹] (N H⁺], 555^{9B})


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

上記工程4にて得られた化合物 (9, 74g, 17, 5mmol) のジクロロメタン (160mL) 溶液に、2, 6-ルチジン (8, 17mL, 70, 1mmol) を-40℃にて加え、-40℃にて10分間撹拌した。反応溶液に無水トリフルオロメタンスルホン酸 (8, 85mL, 52, 6mmol) を-40℃にて加え、-40℃にて30分間撹拌した。反応溶液に10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサソ: 酢酸エチル=95: 5 (v/v) ~70: 35 (v/v)] にて精製した後、NH₂シリカゲルクロマトグラフィー [ヘキサソ: 酢酸エチル=95: 5 (v/v) ~65: 35 (v/v)] にて精製し、目的物 (7, 10g, 59%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.32(1H, s), 7.24(1H, s), 7.15-7.14(1H, m), 5.56-5.53(1H, m), 4.70-4.68(1H, m), 4.66-4.63(1H, m), 4.11-4.01(2H, m), 3.94-3.90(4H, m), 3.84-3.75(1H, m), 3.73-3.68(1H, m), 3.46-3.44(2H, m), 3.18-3.14(1H, m), 1.96-1.88(4H, m), 1.69-1.61(2H, m), 1.02-0.92(2H, m), 0.04(9H, s).
 MS(APCI, ESI)m/z: 689[⁸¹Br, (M+H)⁺], 687[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0335] 工程6: (11aS) -8- [(5-プロモペンチル) オキシ] -7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル) -10- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -5, 11-ジオキソ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5, 11 (10H, 11ah) -ジオン

上記 工程5 化合物 (2, 5mmol) トキシフニ
 シ
 . 5 mmol) ラキス (ジエ ル スフイ
) パラジウム () (炭 , mm ム (2 g, 11
 . 6mmol) の混合物にトルエン (20mL) 、エタノール (10mL) 、水 (10mL) を

室温にて加えた。反応溶液を室温にて30分撹拌した後、反応溶液を酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサソ：酢酸エチル=90：10 (v/v) ~ 50：50 (v/v)〕にて精製し、目的物 (1.71g, 91%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.38-7.37(3H, m), 7.33(1H, s), 7.25(1H, s), 6.89-6.88(2H, m), 5.56-5.54(1H, m), 4.71-4.68(1H, m), 4.65-4.62(1H, m), 4.09-4.04(2H, m), 3.96-3.91(4H, m), 3.85-3.66(5H, m), 3.46-3.45(2H, m), 3.16-3.12(1H, m), 1.99-1.94(4H, m), 1.69-1.64(2H, m), 1.00-0.98(2H, m), 0.04(9H, s).
MS(APCI, ESI)m/z: 647[⁸¹Br, (M+H)⁺], 645[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0336] 工程7: (11aS) -8- [(5-プロモペンチル) オキシ] -7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル) -1, 11a-ジヒドロ-5H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5-オン

上記工程6にて得られた化合物 (0.789g, 1.22mmol) をエタノール (10mL) 、THF (10mL) に溶解し、2.0Mの水素化ホウ素リチウムテトラヒドロフラン溶液 (6.11mL, 12.2mmol) を0℃にて加え、0℃にて3時間撹拌した。反応溶液に水を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣をジクロロメタン (10mL) 、エタノール (20mL) 、水 (10mL) に溶解し、シリカゲル (4g) を室温にて加え、室温で4日間撹拌した。シリカゲルをろ過により除き、水を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサソ：酢酸エチル=60：40〕にて精製し、目的物 (1.496g, 81%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.38-7.37(3H, m), 7.33(1H, s), 7.25(1H, s), 6.89-6.88(2H, m), 5.56-5.54(1H, m), 4.71-4.68(1H, m), 4.65-4.62(1H, m), 4.09-4.04(2H, m), 3.96-3.91(4H, m), 3.85-3.66(5H, m), 3.46-3.45(2H, m), 3.16-3.12(1H, m), 1.99-1.94(4H, m), 1.69-1.64(2H, m), 1.00-0.98(2H, m), 0.04(9H, s).
MS(APCI, ESI)m/z: 647[⁸¹Br, (M+H)⁺], 645[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

程8: フロモ シル) オキシ ー7ーメ キシ 2

(4ーメトキシフェニル) ー1, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-5H-ピロロ [2

上 言 7にて得 . 1 シクロロメ シ

(20 溶液にナトリウム アセ キシ コヒ . 421g,

1) を0℃にて加えた。室温にて2時間撹拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水
溶液を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、
減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘ
キサシ: 酢酸エチル=60:40 (v/v) ~25:75 (v/v)] にて精製し、目的
物 (0.426g, 86%) を得た。

¹H-NMR (₃) .5 7. 32-7 2 5

2 12 2 2 5 55

、 5 81 01 79

[0338] 程9 フロフ 2 シ 1 フロモ シル)

オキシ] ー7ーメトキシ-2- (4ーメトキシフェニル) ー5ーオキシ-11, 11a
ージヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-10 (5H) ー
カルボキシレート

上 言 程 重合 42 . 849 1) シクロロメタン
ピリジン (2 27 1) 、クロコギ アリル

4mL, 54 、 いて15分間撹拌した 反 液に10%

クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を飽和炭酸
水素ナトリウム水溶液で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、

得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサシ: 酢酸エチ
ル=90: (v/v) 50 50 (v/v) 精製し、 的 (0.1 %

を得7

¹H-NMR (₃) :7. 1 s) 1-7 29(2 m) 26-7. (1 m) 89-6.

(2H, m).

$$^{+}(H+I^{3/4}) \rightarrow g_{s_{H}} S_{8S} \quad ^{+}(H+I^{3/4}) \rightarrow g_{s} \wedge S_{S}^{+} z/\wedge S \quad \equiv \quad , 13dV) S I^{3/4}$$

(4) -2- (ルニエ乙シキトズ_バ) -6- オキソ、01- [] (ポロバ-2_ベエ-1_

(1) ル [ル] オキソ { _上_ ズ_オキソ、8- } -6- [] (all) _メ_ トキソ

ル-N- {4- [] () [] (11a' S) -11' - } [tert-ブチル (シメチル)] シ

N : O ほもエ [] (ポロバ-2_エ-1_メルおキソ) カルボニル _ル-バリ

[illegible]

実施例Ⅱ 得られた化合物 (0.130g, 0.161mmol) に上記エタノールに溶解した炭酸カリウム (0.104g, 0.744mmol, 0N, N-ジスチル⁽⁹⁾マアミド (3mL) 溶液に炭酸カリウム (0.0266g, 0.193mmol) を室温にて加え、室温に一晚攪拌した。1%、2%、3%のエタノールと1%の飽和食塩水で洗浄し、減圧蒸気乾燥し、得られた残渣をNH₄シリゲル⁽¹⁰⁾マクロマトグラフィー⁽¹¹⁾にキサンテン⁽¹²⁾とエタノール (0.184g, 84%) をま。

(A) 00 (V) / (V) [工 製 饋 目 0.1849, 88 %) マキ

[0340] 工程11: N- [(プロゾ-2-エソ-1-イルオキシ) カルボニル] -L-バトリン-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - {5- ({ (11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキシ-10- [(プロゾ-2-エソ-1-イルオキシ) カルボニル] -5, 10, 11, 11a'-チトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル) オキシ} ペンチル] オキシ} -5' -オキシ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ} メチル] フェニル} -L-アラニン] ミド

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

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.86(1H, s), 7.60-7.59(2H, m), 7.39(1H, s), 7.32-7.20(7H, m), 6.90-6.88(2H, m), 6.78(1H, s), 6.68(1H, s), 6.38(1H, s), 5.90-5.87(3H, m), 5.39-5.22(6H, m), 4.72-4.02(11H, m), 3.90(3H, s), 3.88(3H, s), 3.83(3H, s), 3.70-3.63(6H, m), 3.32-3.29(3H, m), 2.73-2.69(1H, m), 2.43-2.40(1H, m), 2.12-2.06(1H, m), 1.77-1.74(2H, m), 1.39-1.25(6H, m), 0.96-0.89(6H, m), 0.73-0.66(4H, m). MS(APCI, ESI)m/z: 1198(M+H)⁺

[0341] 工程12: L-バトリン-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - {5- ({ (11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキシ-10, 11, 11a'-チトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} ペンチル) オキシ} -5' -オキシ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -

ピロロ [2, 4] ベンゾジアゼピン, カ

ルボニル} オキシ} メチル} フェニル} ーローア ニンアミド

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

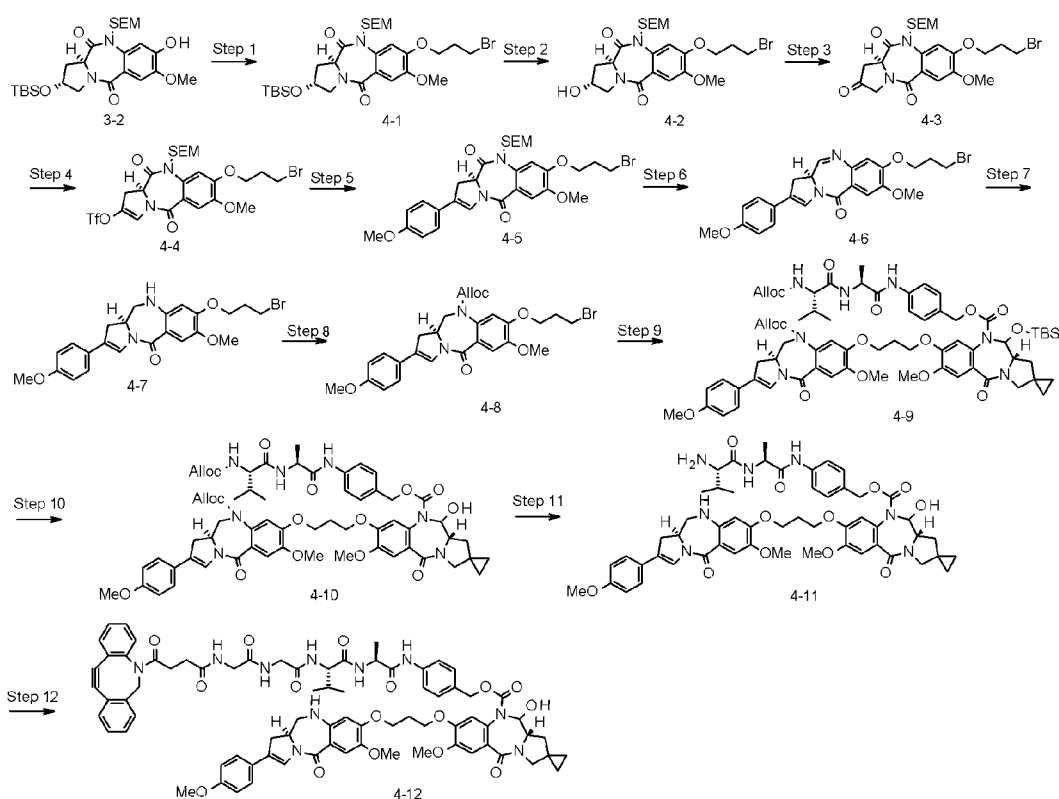
にて精製し、目的物 (0.143g, 99%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9.12(1H, s), 7.94-7.92(1H, m), 7.57-7.53(4H, m), 7.33-7.31(2
H, m), 7.20-7.18(3H, m), 6.90-6.88(2H, m), 6.36(1H, s), 6.07(1H, s), 5.91-5.88(
1H, m), 5.47-5.44(1H, m), 5.21-5.13(1H, m), 4.66-4.58(3H, m), 4.32(1H, s), 4.03
-3.49(17H, m), 3.38-3.29(4H, m), 3.15-3.14(1H, m), 2.77-2.73(1H, m), 2.57(2H,
s), 2.43-2.40(1H, m), 2.32-2.27(1H, m), 1.81-1.39(8H, m), 0.98-0.96(3H, m), 0.
85-0.83(3H, m), 0.75-0.62(4H, m).
¹H-NMR(CD₃OD, 50°C) δ : 7.84(1H, s), 7.56-7.48(2H, m), 7.44-7.32(4H, m), 7.26-7.
.13(3H, m), 6.89(2H, d, J=8.5Hz), 6.78-6.66(1H, m), 6.26(1H, s), 5.96(1H, d, J=9
.7Hz, H_{11'}), 5.27(1H, d, J=12.1Hz), 4.96-4.78(1H, m), 4.63-4.58(2H, m), 4.49(1H
, q, J=6.9Hz), 4.28-4.19(1H, m), 4.07-3.89(4H, m), 3.85(3H, s), 3.79(3H, s), 3.7
6(3H, s), 3.67(1H, d, J=11.5Hz), 3.61(1H, d, J=13.3Hz), 3.54(1H, dd, J=9.7, 8.2H
z, H_{11'}), 3.43-3.31(2H, m), 3.21(1H, d, J=11.5Hz), 3.14(1H, d, J=4.8Hz), 2.78(1H
, dd, J=16.6, 4.5Hz), 2.43(1H, dd, J=13.0, 8.2Hz, H_{1'}), 2.05-1.93(1H, m), 1.91-1.
7. (1, 2, 7-1, 5, a), 7. (4)

MS(APCI、ESI) m/z :1431(M+H) $^{+}$

〕 実施例4：薬物リンカー2

[化128]



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

実施例3工程1にて得られた化合物 (5.06g, 9.67mmol) と1, 3-ジブロモプロ

ロ (4 48.4mm を、 例 程2と同様に反応 的 4.

85g, 78%) を得て

¹ H-	7. (1	7.2 (1	52	(1	7-	(1
4.61-4	m), 4.5	4.14	2	2	2	7-
1	(1	4	2	(1	2	2
7(	1					

、⁸¹ (M+H)⁺], 643[⁷⁹Br,

[0344] 工程2: (2R, 11aS)-8- (3-プロモフロボキシ)-2-ヒドロキシ-7-メトキシ-1

0- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -2, 3-ジヒドロ-1H

-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5, 11 (10H, 11aH) -ジオ

シ

上記工程1にて得られた化合物 (4. 85g, 7. 54mmol) を、実施例3工程3と

同様に反応させ、目的物 (4. 05g, 定量的) を得た。

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

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

[0345] 工程3: (11aS) -8- (3-プロモフロボキシ) -7-メトキシ-10- { [2-

(トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4]

ベンゾジアゼピン-2, 5, 11 (3H, 10H, 11aH) -トリオン

上記工程2にて得られた化合物 (7. 54mmol) を、実施例3工程4と同様に反

応させ、目的物 (3. 73g, 93%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.34(1H, s), 7.29(1H, s), 5.56-5.53(1H, m), 4.72-4.69(1H, m), 4.67-4.61(1H, m), 4.23-4.17(3H, m), 3.97-3.88(4H, m), 3.82-3.75(1H, m), 3.74-3.56(4H, m), 2.82-2.77(1H, m), 2.43-2.38(2H, m), 1.06-0.94(2H, m), 0.08-0.00(9H, m).

[0346] 工程4: (11aS)-8-(3-プロモフロボキシ)-7-メトキシ-5, 11-ジオキノ-10-{2-

トリフルオロメタン
クロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジフェニ-2-イル トリフルオロメタン
スルフォネート

上記工程 7 g, mm を、実施例3工 と
同 (c) 応 的 2 g, 7 得

¹H-NMR (s) 4.70-4. 2 m), 4. 2 4H, (1
4(3H m), 4-2 (2) 2 (2 m),

、
[81 79)

[0347] 工程5: (11a5) -8- (3-プロモフロボキシ) -7-メトキシ-2- (4-メ
トキシフェニル-10- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -1H
-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジフェニ-5, 11 (10H, 11aH) -ジオ

上記工程4にて得られた化合物 (3. 27g, 4. 96mmol) を、実施例3工程6と
同様に反応させ、目的物 (2. 49g, 81%) を得た。

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 7.49-7.47(2H, m), 7.40(1H, s), 7.31-7.24(2H, m), 6.93-6.88
(2H, m), 5.33-5.31(1H, m), 5.25-5.18(1H, m), 4.81-4.80(1H, m), 4.23-4.10(2H, m
(2H, m), 3.85(3H, s), 3.77(3H, s), 3.70-3.59(3H, m), 3.52-3.40(2H, m), 3.15-3.08(1H,
m), 2.33-2.27(2H, m), 0.86-0.74(2H, m), -0.07(9H, s).

MS(APCI, ESI)m/z: 619[⁸¹Br, (M+H)⁺], 617[⁷⁹Br, (M+H)⁺].
[0348] 工程6: (11a5) -8- (3-プロモフロボキシ) -7-メトキシ-2- (4-メ
トキシフェニル) -1, 11a-ジピロ-5H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベン

ゾジフェニ-5-オン
上記工程5にて得られた化合物 (2. 49g, 4. 04mmol) を、実施例3工程7と
同様に反応させ、目的物 (1. 59g, 84%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z: 473[⁸¹Br, (M+H)⁺], 471[⁷⁹Br, (M+H)⁺].
[0349] 工程7: (11a5) -8- (3-プロモフロボキシ) -7-メトキシ-2- (4-メ

ヨ レ 10, 11, テ ラヒド 1-c]

[1, 4] ベンゾジアゼピン-5-オン

上記工程6にて得られた化合物 (1. 59g, 3. 38mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させ、目的物 (1. 39g, 87%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.54(1H, s), 7.54-7.51(1H, m), 7.32-7.29(2H, m), 6.89-6.87(2H, m), 6.10(1H, s), 4.32-4.28(2H, m), 4.14-4.13(2H, m), 3.85(3H, s), 3.82(3H, s), 3.63-3.62(2H, m), 3.57-3.55(2H, m), 3.40-3.36(1H, m), 2.76-2.72(1H, m), 2.40-2.37(2H, m).

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

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

上記工程7にて得られた化合物 (1. 40g, 0. 2. 95mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 885g, 54%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.34(1H, s), 7.27-7.25(2H, m), 7.22(1H, s), 6.86-6.84(2H, m), 6.73(1H, s), 5.76-5.74(1H, m), 5.11-5.09(2H, m), 4.62-4.59(2H, m), 4.33-4.31(1H, m), 4.16-4.13(3H, m), 3.88(3H, s), 3.79(3H, s), 3.60-3.59(3H, m), 3.27-3.23(1H, m), 2.69-2.65(1H, m), 2.37-2.34(2H, m).

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

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

} メチル) フエニル] —L—アラニンアミド

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

MS(APCI、ESI)m/z : 1284(M+H)⁺.

[0352] 工程10 : N- { [(プロプ—2—エン—1—イル) オキシ] カルボニル} - L—バリル—N— [4- ({ [(1Γ aS) - 11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' - (3- { [(11aS) —7—メトキシ—2— (4—メトキシフエニル) —5—オキソ—10— { [(プロプ—2—エン—1—イル) オキシ] カルボニル} -5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1_c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8—イル] オキシ} プロボキシ) —5' —オキソ—1Γ, 1Γ a—ジヒドロ—Γ H, 3' H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1_c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —カルボニル] オキシ} メチル) フエニル] —L—アラニンアミド

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

MS(APCI、ESI)m/z : 1170(M+H)⁺.

[0353] 工程11 : L—バリル—N— [4- ({ [(11' aS) —11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' - (3- { [(11aS) —7—メトキシ—2— (4—メトキシフエニル) —5—オキソ—5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8—イル] オキシ} プロボキシ) —5' —オキソ—1Γ, 1Γ a—ジヒドロ—Γ H, 3' H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —カルボニル] オキシ} メチル) フエニル] —L—アラニンアミド

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

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9.16(1 H, s), 7.93-7.91(1 H, m), 7.55-7.52(1 H, m), 7.50-7.47(3 H, m), 7.35-7.32(2 H, m), 7.21(1 H, s), 7.13-7.11(2 H, m), 6.90-6.87(2 H, m), 6.40(1 H, s), 6.08(1 H, s), 5.90-5.87(1 H, m), 5.37-5.34(1 H, m), 4.73-4.53(3 H, m), 4.23

-4. 08(5H, m), 3.89(3H, s), 3.82(3H, s), 3.78-3.72(5H, m), 3.57-3.51(3H, m), 3.38-3.30(3H, m), 2.76-2.71(1H, m), 2.36-2.24(4H, m), 1.78-1.42(6H, m), 1.00-0.98(3H, m), 0.87-0.84(3H, m), 0.74-0.62(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 1002(M+H)⁺.

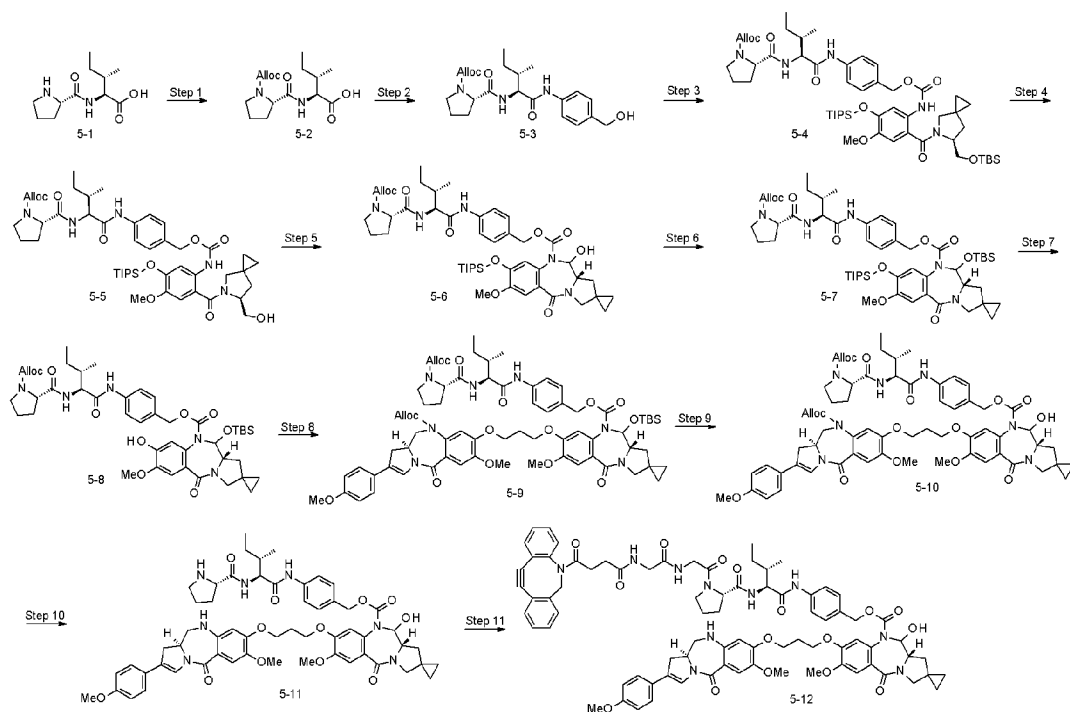
[0354] 工程 12 : N-[4-(1, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソプタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N[4-({[(1ΓaS)-1, -ヒドロキシ-7'-メトキシ-8']-(3-[(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-1Γ, 11'-a-ジヒドロ-1'-H, 3'-Hスピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'-H)-カルボニル]オキシ}メチル)フェニル]-L-アラニンアミド

上記工程 11にて得られた化合物 (0.189g, 0.189mmol) を、実施例 3 工程 13 と同様に反応させ、目的物 (0.169g, 64%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1402(M+H)⁺.

[0355] 実施例 5 : 薬物リンカー 3

[化 129]



工程 1: 1- [(プロパン-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル] -L-プロリン-L-イソロイシン

L-プロリン-L-イソロイシン (1. 00g, 4. 40mmol) の 1mol/l 水酸化ナトリウム水溶液 (8. 80mL, 8. 80mmol)、1, 4-ジオキサン (30ml 溶液に、0℃において、クロロギ酸アリル (0. 690mL, 6. 53mmol) をゆっくりと滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌した後、反応混合物に硫酸水素カリウム水溶液を加え、pH4程度に調整し、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下で濃縮し、残渣にヘキサンを加えた。生じた固体を濾取、乾燥させることにより目的物 (1. 20g, 88%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :311 (M-H) -

[0356] 工程 2: 1- [(プロパン-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル] -L-プロリン-N-[4- (ヒドロキシメチル)フェニル]-L-イソロイシンアミド

上記工程 1にて得られた化合物 (13. 7g, 43. 4mmol) と4-アミノベンジルアルコール (6. 00g, 48. 7mmol) の THF 溶液 (100ml) に、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (12. 0g, 48. 7mmol) を室温にて加えた。反応溶液を室温にて23時間攪拌し、ジエチルエーテル (200mL) を加えた後、生じた固体を濾取し、得られた化合物 (13. 2g, 65%) をそのまま次の反応に用いた。

[0357] 工程 3: 1- [(プロパン-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル] -L-プロリン-N-[4- ({ [(2- { [(6S)-6- ({ [tert -ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -5- アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] カルボニル} -4-メトキシ-5- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバモイル] オキシ} メチル) フェニル]-L-イソロイシンアミド

上記工程 2にて得られた化合物 (6. 87g, 16. 5mmol) を、実施例 1工程 6と同様に反応させ、目的物 (7. 46g, 56%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) S :8. 99-8. 97(1 H, m), 8. 45-8. 42(1 H, m), 7. 81-7. 49(3H, m), 7. 36-7

. 33(2H, m), 6.81-6.77 (2H, m), 5.96-5.91 (1H, m), 5.32-5.23(2H, m), 5.13-5.10(2H, m), 4.73-4.30 (6H, m), 4.00-3.98(1H, m), 3.78-3.52(7H, m), 3.06-3.02(1H, m), 2.37-2.12(5H, m), 2.06-1.92(1H, m), 1.77-1.48(2H, m), 1.32-1.27(3H, m), 1.11-1.09(18H, m), 1.03-0.91 (15H, m), 0.66-0.44 (4H, m), 0.09-0.04(6H, m).

[0358] 工程4: 1—[(プロポ—2—エン—1—イルオキシ)カルボニル]—L—プロリル—N—[4—{(2—{(6S)—6—(ヒドロキシメチル)—5—アザスピロ[2.4]ヘプト—5—イル)カルボニル}—4—メトキシ—5—{[トリ(プロパン—2—イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]—L—イソロイシンアミド

上記工程3にて得られた化合物 (7.46g, 7.41mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (6.07g, 92%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z :892(M+H)⁺

[0359] 工程5: 1—[(プロポ—2—エン—1—イルオキシ)カルボニル]—L—プロリル—N—{4—[(11a'S)—11'—ヒドロキシ—7'—メトキシ—5'—オキソ—8'—{[トリ(プロパン—2—イル)シリル]オキシ}—11', 11a'—ジヒドロ—H—スピロ[シクロプロパン—1,2'—ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]—10' (5'H)—イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル]—L—イソロイシンアミド

上記工程4にて得られた化合物 (6.07g, 6.80mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (4.18g, 69%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z :890(M+H)⁺

[0360] 工程6: 1—[(プロポ—2—エン—1—イルオキシ)カルボニル]—L—プロリル—N—{4—[(11a'S)—11'—{tert—プチル(ジメチル)シリル]オキシ}—7'—メトキシ—5'—オキソ—8'—{[トリ(プロパン—2—イル)シリル]オキシ}—11', 11a'—ジヒドロ—H—スピロ[シクロプロパン—1,2'—ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]—10' (5'H)—イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル]—L—イソロイシンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (4. 18g, 4. 70mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (4. 26g, 90%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1004(M+H) +

[0361] 工程7: 1— [(プロポ₂—エン—1—イルオキシ) カルボニル] —L—プロリル—N— {4— [({ [(11a' S) - 11' - { [tert—プチル (ジメチル) シリル] オキシ} _8' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロシクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—イソロイシニアミド

上記工程6にて得られた化合物 (4. 26g, 4. 70mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (2. 48g, 69%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8. 44-8. 41 (1H, m), 7. 53-7. 37 (1 H, m), 7. 24-7. 23 (1 H, m), 7. 14-7. 11 (2H, m), 6. 82 (1 H, s), 6. 67-6. 65 (1 H, m), 6. 11-6. 07 (1 H, m), 5. 99-5. 95 (2H, m), 5. 33-5. 02 (4H, m), 4. 84-4. 41 (5H, m), 3. 94 (3H, s), 3. 73-3. 70 (1 H, m), 3. 59-3. 52 (4H, m), 3. 29-3. 26 (1 H, m), 2. 39-2. 24 (5H, m), 1. 99-1. 97 (2H, m), 1. 56-1. 53 (1 H, m), 1. 10-0. 64 (1 9H, m), 0. 20-0. 16 (3H, m), 0. 09-0. 07 (3H, m) .

MS(APCI、ESI)m/z : 848(M+H) +

[0362] 工程8: 1— [(プロポ—2—エン—1—イルオキシ) カルボニル] —L—プロリル—N— {4— [({ [(11a, S) _7' —メトキシ—8' - [3- ({ (11aS) _7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) _5—オキソ—10— [(プロポ₂—エン—1—イルオキシ) カルボニル] _5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル} オキシ) プロボキシ] _5' —オキソ—1Γ - [(トリメチルシリル) オキシ] —11', 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—イソロイシニアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0. 200g, 0. 236mmol) を、実施例4工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 308g, 99%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1324(M+H) +

[0363] 工程 9 : 1— [(プロップ—2—エン—1—イルオキシ) カルボニル] —L—プロリル—N— {4— [({ [(11a' S) —11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' — (3— ({ (11aS) —7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) —5—オキソ—10— [(プロップ—2—エン—1—イルオキシ) カルボニル] —5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル} オキシ) プロボキシ] —5' —オキソ—11' , 11a' —ジヒドロ—1' H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—イソロイシンアミド

上記工程 8 にて得られた化合物 (0. 308g, 0. 233mmol) を、実施例 3 工程 11 と同様に反応させ、目的物 (0. 261 g, 93%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1210(M+H) +

[0364] 工程 10 : L—プロリル—N— {4— [({ [(11a, S) —11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' — (3— { [(11aS) —7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) —5—オキソ—5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル] オキシ} プロボキシ) —5' —オキソ—11' , 11a' —ジヒドロ—1' H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—イソロイシンアミド

上記工程 9 にて得られた化合物 (0. 261 g, 0. 216mmol) を、実施例 3 工程 12 と同様に反応させ、目的物 (0. 183g, 81%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9. 06(1 H, s), 8. 33-8. 31(1H, m), 7. 53-7. 47(4H, m), 7. 33-7. 31(2 H, m), 7. 21(1H, s), 7. 11-7. 09(2H, m), 6. 89-6. 87(2H, m), 6. 40(1 H, s), 6. 08(1 H, s), 5. 91-5. 88(1 H, m), 5. 35-5. 32(1 H, m), 4. 69-4. 66(2H, m), 4. 45-4. 28(3H, m), 4. 15-4. 05(3H, m), 3. 87(3H, s), 3. 82(3H, s), 3. 78(3H, s), 3. 74-3. 72(3H, m), 3. 64-3. 47(3H, m), 3. 37-3. 30(2H, m), 3. 04-3. 00(1 H, m), 2. 94-2. 88(1 H, m), 2. 75-2. 72(1 H, m), 2. 42-2. 39(1 H, m), 2. 13-2. 05(4H, m), 1. 92-1. 55(6H, m), 1. 20-1. 14(1 H, m), 0.

98-0. 96(3H, m), 0.91-0.89(3H, m), 0.70-0.66(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 1042(M+H)⁺

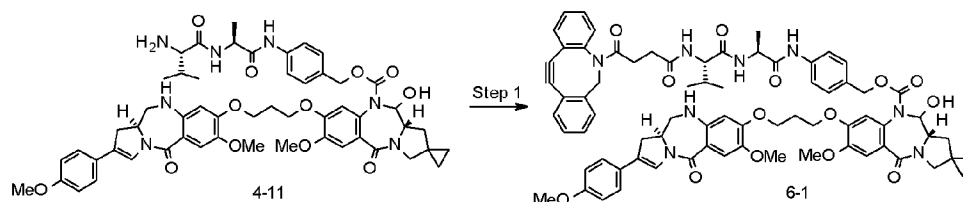
[0365] 工程 11 : N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソプタノイル]グリシルグリシル-L-プロリル-N-{4-[(3-{[(11a, S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ}メチル]フェニル}-L-イソロイシンアミド

上記工程 10にて得られた化合物 (0.0474g, 0.455mmol) を、実施例 3 工程 13 と同様に反応させ、目的物 (0.0495g, 75%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1443(M+H)⁺

[0366] 実施例 6 : 薬物リンカー 4

[化 130]

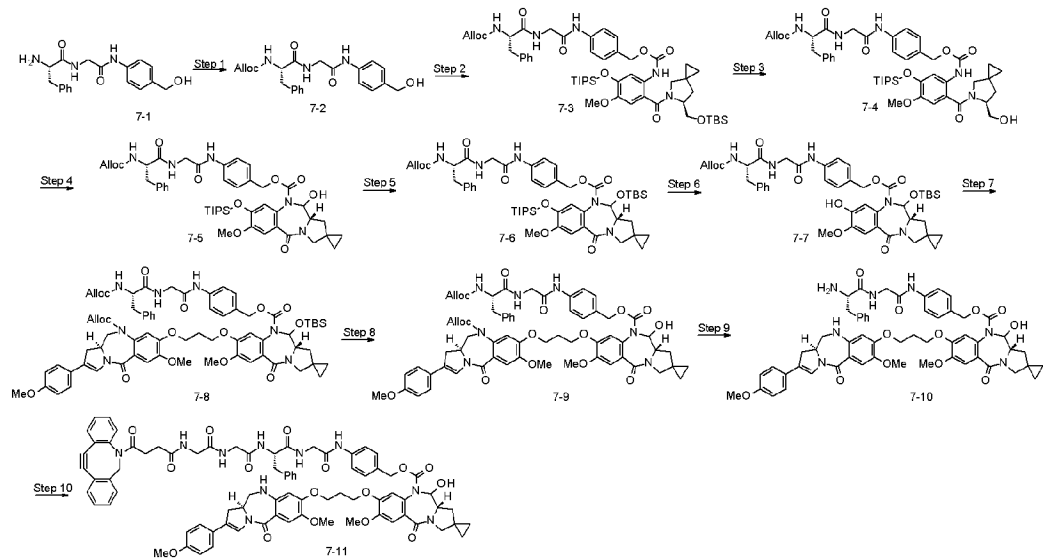


工程 1 : 実施例 4 工程 11 で得られた化合物 (0.0564g, 0.0563mmol)、トリエチルアミン (0.00936mL, 0.0675mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (5mL) 溶液に、室温にて 1-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソプタノイル]オキシ}ピロリジン-2, 5-ジオン (0.0249g, 0.0619mmol) を加えた。室温にて 2 時間攪拌した後、減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 99.5 : 0.5 (v/v) ~ 90 : 10 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.0490g, 68%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1289(M+H)⁺

[0367] 実施例7：薬物リンカー5

[化131]



工程1：N-[(プロパ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-フェニルアラニル-N-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]グリシンアミド

出発物質7-1(1.24g, 3.80mmol, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2015, 3, 3237-3247)、炭酸カリウム(0.945g, 6.84mmol)のTHF(18mL)、水(12mL)溶液に、0℃にてクロロギ酸アリル(0.482mL, 4.560mmol)を加え、室温にて1時間加えた。酢酸エチルで抽出した後、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去した後、得られた残渣を少量の酢酸エチルに溶解させ、ジエチルエーテルを加えた。生じた固体(1.30g, 83%)を濾取し、そのまま次の反応に用いた。

[0368] 工程2：N-[(プロパ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-フェニルアラニル-N-[4-(2-((6S)-6-((tert-ブチル(ジメチル)シリル)オキシ)メチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル)カルボニル]-4-メトキシ-5-((トリ(プロパン-2-イル)シリル)オキシ)フェニル)カルバモイル]オキシ]メチル)フェニル]グリシンアミド

上記工程1にて得られた化合物(1.30g, 3.16mmol)を、実施例1工程6と

同様に反応させ、目的物 (1. 32g, 54%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 9.01 (1H, s), 8.38 (1H, s), 7.80 (1H, s), 7.60-7.58 (2H, m), 7.32-7.29 (5H, m), 7.19-7.18 (2H, m), 6.76 (1H, s), 6.55 (1H, s), 5.89-5.83 (1H, m), 5.24-5.13 (5H, m), 4.56-4.55 (3H, m), 4.34-4.33 (1H, m), 4.10-4.06 (1H, m), 3.98-3.94 (2H, m), 3.75-3.72 (5H, m), 3.16-3.08 (3H, m), 2.28-2.25 (1H, m), 1.70-1.68 (1H, m), 1.30-1.27 (3H, m), 1.11-1.09 (18H, m), 0.90 (9H, s), 0.65-0.48 (4H, m), 0.05-0.02 (6H, m). MS(APCI, ESI)m/z: 1000(M+H)⁺

[0369] 工程3: N-[(プロポ₂エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-フェニルアラニル-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシ-5-{[トリ(プロパン₂イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]グリシンアミド

上記工程2にて得られた化合物 (1. 32g, 1. 32mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (1. 23g, 定量的) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.48-8.38 (2H, m), 7.71 (1H, s), 7.61-7.59 (2H, m), 7.36-7.27 (5H, m), 7.20-7.18 (2H, m), 6.76 (1H, s), 6.55-6.52 (1H, m), 5.89-5.83 (1H, m), 5.28-5.13 (5H, m), 4.56-4.55 (3H, m), 4.34-4.33 (1H, m), 4.22-4.20 (1H, m), 4.10-4.06 (1H, m), 3.98-3.94 (1H, m), 3.78-3.75 (5H, m), 3.64-3.62 (1H, m), 3.17-3.07 (3H, m), 1.84-1.83 (2H, m), 1.30-1.26 (3H, m), 1.11-1.09 (18H, m), 0.61-0.49 (4H, m). MS(APCI, ESI)m/z: 886(M+H)⁺

[0370] 工程4: N-[(プロポ₂エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-フェニルアラニル-N-{4-[(11a'-S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキソ-8'-{[トリ(プロパン₂イル)シリル]オキシ}-1Γ, 11a'-ジヒドロ-Γ_Hスピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c] [1,4]ベンゾジアゼピン]-10' (5'-H)-イル]カルボニル]オキシ}メチル]フェニル]グリシンアミド

上記工程3にて得られた化合物 (1. 32mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (0. 660g, 57%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.34(1 H, s), 7.53-7.51(2H, m), 7.26-7.18(8H, m), 6.66-6.57(2 H, m), 5.88-5.80(2H, m), 5.27-5.21(3H, m), 5.11-5.07(1 H, m), 4.99-4.96(1 H, m), 4.55-4.54(2H, m), 4.36-4.34(1 H, m), 4.13-3.92(2H, m), 3.83(3H, s), 3.73-3.70(1 H, m), 3.57-3.55(1 H, m), 3.46-3.44(1 H, m), 3.32-3.29(1 H, m), 3.18-3.15(1 H, m), 3.09-3.05(1 H, m), 2.42-2.38(1 H, m), 1.75-1.72(1 H, m), 1.25-1.02(21 H, m), 0.73-0.60(4H, m).

MS(APCI, ESI)m/z : 884(M+H)⁺

[0371] 工程5 : N₁ [(プロポ₂ エン—1₁ イルオキシ) カルボニル] ₁ —フエニルアラニル—N₁ {4₁ [({ [(11a' S) - 11' - { [tert ₁ プチル (ジメチル) シリル] オキシ} ₇ —メトキシ₅ —オキソー₈ - { [トリ (プロパン—2₁ イル) シリル] オキシ} - 11' , 11a' —ジヒドロ₁ Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フエニル} グリシンアミド

上記工程4にて得られた化合物 (0.834g, 0.943mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (0.555g, 59%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.26-8.23(1 H, m), 7.51-7.50(2H, m), 7.29-7.28(3H, m), 7.18-7.13(5H, m), 6.64-6.62(1 H, m), 6.52-6.49(1 H, m), 6.02-6.00(1 H, m), 5.88-5.83(1 H, m), 5.25-5.17(4H, m), 4.84-4.81(1 H, m), 4.55-4.55(2H, m), 4.34-4.33(1 H, m), 4.06-3.97(2H, m), 3.84(3H, s), 3.71-3.68(1 H, m), 3.50-3.48(1 H, m), 3.28-3.05(3H, m), 2.36-2.33(1 H, m), 1.56-1.53(1 H, m), 1.28-1.01(21 H, m), 0.81-0.61(13H, m), 0.19(3H, s), 0.09(3H, s). MS(APCI, ESI)m/z : 998(M+H)⁺

[0372] 工程6 : N₁ [(プロポ₂ エン—1₁ イルオキシ) カルボニル] ₁ —フエニルアラニル—N₁ {4₁ [({ [(11a' S) - 11' - { [tert ₁ プチル (ジメチル) シリル] オキシ} ₈ —ヒドロキシ—7' —メトキシ₅ —オキソー₁ Γ , 11a' —ジヒドロ₁ Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] ₁₀ (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フエニル} グリシンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (0.555g, 0.556mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0.451g, 96%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 8.42-8.40 (1H, m), 7.50-7.46 (2H, m), 7.28-7.26 (3H, m), 7.20-7.18 (3H, m), 7.10-7.08 (2H, m), 6.67-6.65 (2H, m), 6.16-6.13 (1H, m), 6.02-5.99 (1H, m), 5.88-5.82 (1H, m), 5.28-5.18 (4H, m), 4.87-4.84 (1H, m), 4.54-4.53 (2H, m), 4.38-4.36 (1H, m), 4.10-4.07 (1H, m), 3.93-3.90 (4H, m), 3.72-3.69 (1H, m), 3.54-3.52 (1H, m), 3.25-3.17 (2H, m), 3.08-3.04 (1H, m), 2.36-2.33 (1H, m), 1.57-1.54 (1H, m), 0.81-0.61 (13H, m), 0.19 (3H, s), 0.10 (3H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 842 (M+H)⁺

[0373] 工程7: N-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-フェニルアラニル-N-{4-[({ [(11a'S)-11'-tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7'-メトキシ-8'-[3-({ (11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-10-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ)プロボキシ]-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}グリシンアミド

上記工程6にて得られた化合物 (0.115g, 0.137mmol) を、実施例4工程9と同様に反応させ、目的物 (0.160g, 89%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1318 (M+H)⁺

[0374] 工程8: N-[(プロポ-2-エン-1-イル)カルボニル]-L-フェニルアラニル-N-{4-[({ [(11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[3-({ (11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-10-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル}オキシ)プロボキシ]-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジ

アゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル
} グリシンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0. 160g, 0. 121mmol) を、実施例3工程11
と同様に反応させ、目的物 (0. 136g, 93%) を得た。

] 工程9 : L-フェニルアラニル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒド
ロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11aS) -7-メトキシ-2- (4-
メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロ
ロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ)
-5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1
, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イ
ル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} グリシンアミド

上記工程8にて得られた化合物 (0. 136g, 0. 113mmol) を、実施例3工程12
同 に反応さ 的 を得た

程 ヒド ジ ソ ア `シ
) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニルアラニ
l (1 ' ' ヒドコキシ ' ャ ' ,
' ャ ' ャ ' レ 5 キ
ソ テ ラヒドロ 1 ピロロ 1-c] ソ
ジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ) -5' -オキソ-11' , 11a' -
ジヒド ' スピ シ ロ ロ ' ピ ロ

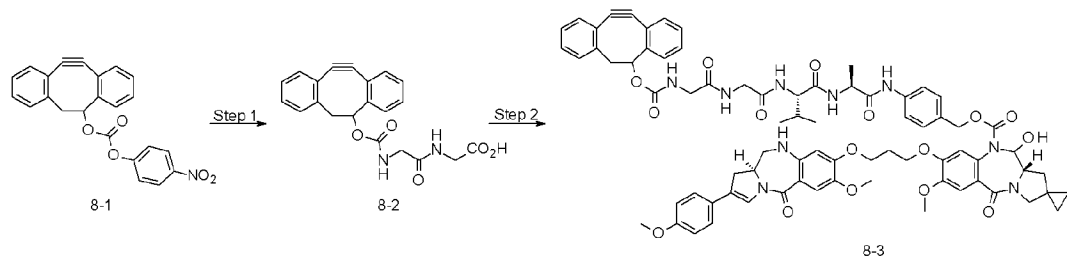
[4] ベンゾジアゼピン] _ 10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチ
ル] フェニル} グリシンアミド

上記工程9にて得られた化合物 (0. 0372g, 0. 0359mmol) を、実施例3工程
13同様に反応させ、目的物 (0. 0170g, 33%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1437(M+H) +

[0377] 実施例8：薬物リンカー6

[化132]



工程1：N— [(11, 12-ジデヒドロ-5, 6-ジヒドロベンゾ [a, e] [8]
] アヌレン-5-イルオキシ) カルボニル] グリシルグリシン

11, 12-ジデヒドロ-5, 6-ジヒドロベンゾ [a, e] [8] アヌレン-5-イル
4-ニトロフェニルカルバメート (0. 437g, 1. 14mmol), N, N-ジイソプロピル
エチルアミン (0. 198mL, 1. 14mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (6mL) 溶液
にグリシルグリシン (0. 150g, 1. 14mmol)、水 (3mL) を室温にて加え、室温に
て一晩撹拌した。減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグ
ラフィー [クロロホルム : CMW = 100 : 0 (v/v), ~0 : 100 (v/v)] にて精製し、目的
物 (0. 324g, 75%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 378(M+H) +

[0378] 工程2：N— [(11, 12-ジデヒドロ-5, 6-ジヒドロベンゾ [a, e] [8]
アヌレン-5-イルオキシ) カルボニル] グリシルグリシル-L-バリン-N-
{4- [({ [(11a, S)-1H-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-
{ [(11aS)-7'-メトキシ-2'-(4'-メトキシフェニル)-5'-
10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼ
ピン-8-イル] オキシ} プロボキシ)-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒド

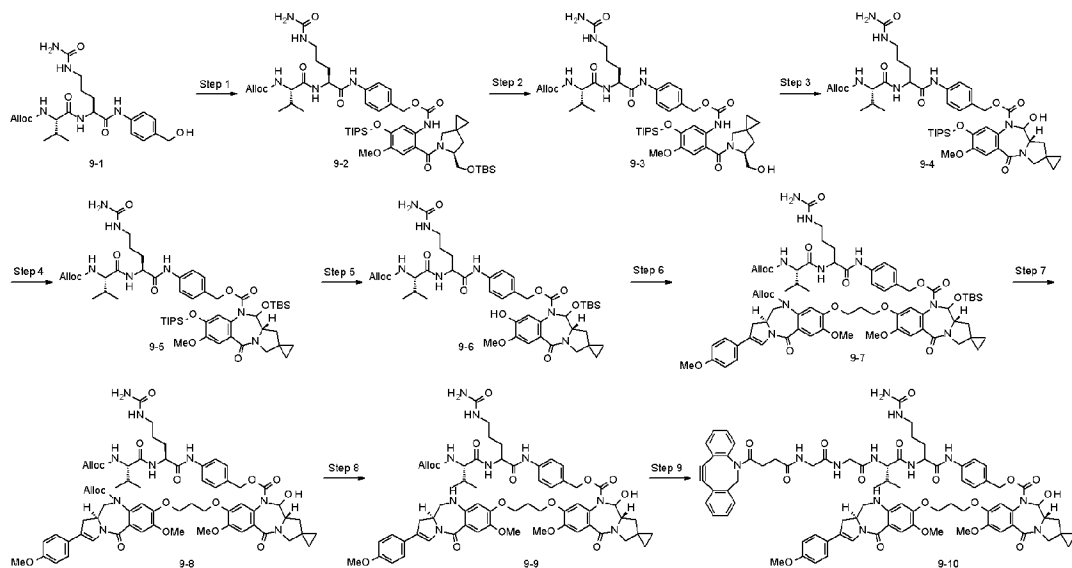
ロ_Γ_H_スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程1にて得られた化合物 (0.0306g, 0.0305mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.0361g, 87%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 1362(M+H)⁺

[0379] 実施例9：薬物リンカー7

[化133]



工程1 : N-[(プロパン-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-[4- ({ [(2- { [(6S)-6- ({ [tert-ブチル (ジメチル)シリル]オキシ}メチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシ-5- { [トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]-N⁶-カルバモイル-L-オルニチンアミド

出発物質9-1を、実施例1工程6と同様に反応させ、目的物 (1.37g, 45%) を得た。

¹H-NMR(CDMSO-D₆) δ : 10.06(1H, s), 9.16(1H, s), 8.10-8.06(1H, m), 7.62-7.60(2H, m), 7.33-7.31(2H, m), 7.27-7.24(2H, m), 6.84-6.81(1H, m), 5.94-5.89(2H, m), 5.

, 0.88-0.75(15H, m), 0.51-0.49(4H, m), 0.05-0.17(6H, m).

MS(APCI、ESI) m/z :1052(M+H)⁺

工程2: N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N⁵-カルバモイル-N-[4-({ [(2- { [(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシ-5-{ [トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}フェニル)カルバモイル]オキシ}メチル)フェニル]-L-オルニチンアミド

上記工程1にて得られた化合物(1.37g, 1.31mmol)を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物(1.00g, 82%)を得た。

¹H-NMR(DMSO-D₆) δ : 10.07(1H, s), 9.13(1H, s), 8.11-8.09(1H, m), 7.62-7.60(2H, m), 7.34-7.31(2H, m), 7.26-7.23(2H, m), 6.92-6.90(1H, m), 5.97-5.86(2H, m), 5.41(2H, s), 5.32-5.28(1H, m), 5.19-5.16(1H, m), 5.04(2H, s), 4.80(1H, s), 4.48-4.41(3H, m), 4.27(1H, s), 3.93-3.87(1H, m), 3.74(3H, s), 3.61-3.58(2H, m), 3.39-3.30(2H, m), 3.03-2.97(3H, m), 2.00-1.84(2H, m), 1.65-1.60(2H, m), 1.44-1.37(2H, m), 1.26-1.19(3H, m), 1.05-1.04(18H, m), 0.87-0.83(6H, m), 0.53-0.42(4H, m).

MS(APCI、ESI) m/z :938(M+H)⁺

工程3: N-[(プロプ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N⁵-カルバモイル-N-{4-[({ [(11a' S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキシ-8'- { [トリ(プロパン-2-イル)シリル]オキシ}-11' , 11a'-ジヒドロ-1' H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル]-L-オルニチンアミド

上記工程2にて得られた化合物(1.00g, 1.07mmol)、ジクロロメタン(80mL)、ジメチルホルムアミド(10mL)の混合物に、0℃にてデスマーチンペルヨ

[illegible]

SI/IS (VpI) m/z: 1 060 (%I+H)+

[0383]

10-0.99 (21H, m), 0.78-0.61 (19H, ϕ , 0.77 (3H, s), 0.00 (3H, s)).

上層にエタノールに可溶な化合物 (0.355g, 0.712 mmol) を、実例 1 に
 同様に、目録 (0.264g, 93%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.07-1.03 (1H, m), 0.99-0.86 (1H, m), 0.81-0.78 (1H, m), 0.74-0.71 (1H, m), 0.71-0.68 (1H, m), 0.66-0.63 (1H, m), 0.61-0.58 (1H, m), 0.57-0.54 (1H, m), 0.53-0.50 (1H, m), 0.49-0.46 (1H, m), 0.45-0.42 (1H, m), 0.41-0.38 (1H, m), 0.35-0.32 (1H, m), 0.31-0.28 (1H, m), 0.25-0.22 (1H, m), 0.19-0.16 (1H, m), 0.15-0.12 (1H, m), 0.11-0.08 (1H, m), 0.05-0.02 (1H, m), 0.01-0.00 (1H, m).

SI/IS (VpI) m/z: 1768 (%I+H)+

[0384] エタノールに可溶な化合物 (0.113g, 0.126 mmol) を、実例 1 に
 同様に、目録 (0.264g, 93%) を得た。
 上層にエタノールに可溶な化合物 (0.113g, 0.126 mmol) を、実例 1 に
 同様に、目録 (0.264g, 93%) を得た。

と同様に反応させ、目的物 (0. 149g, 86%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1370(M+H) +

[0385] 工程7 : N₅-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L- バリル
 -N₅-カルバモイル-N-{4-[({[(11a, S) -11'-ヒドロキシ-7'-
 -メトキシ-8'-(3- ((11aS) -7-メトキシ-2-(4-メトキシフェ
 ニル) -5-オキソ-10-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル
] -5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾ
 ジアゼピン-8-イル} オキシ) プロボキシ] -5'-オキソ-1Γ, 11a'-
 ジヒドロ-Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1
 , 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチ
 ル] フェニル} -L-オルニチンアミド

上記工程6にて得られた化合物 (0. 149g, 0. 109mmol) を、実施例3工程11
 と同様に反応させ、目的物 (0. 119g, 87%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1256(M+H) +

[0386] 工程8 : L-バリル-N₅-カルバモイル-N-{4-[({[(11a' S) -11, -ヒドロキ
 シ-7'-メトキシ-8'-(3-[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェ
 ニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾ
 ジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ) -5'-オキソ-1Γ, 11a'-ジヒ
 ドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾ
 ジアゼピン] -10' (5' H)-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル}-1-
 -オルニチンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0. 050g, 0. 0398mmol) を、実施例3工程1
 2と同様に反応させ、目的物 (0. 0347g, 80%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9.43(1 H, s), 7.96-7.94(1 H, m), 7.51-7.46(4H, m), 7.33-7.31(2
 H, m), 7.22(1 H, s), 7.13-7.11(2H, m), 6.90-6.87(2H, m), 6.46(1 H, s), 6.11(1H, s)
 , 5.92-5.89(1 H, m), 5.42-5.39(2H, m), 4.78-4.67(4H, m), 4.31-4.29(1 H, m), 4.11
 -4.04(3H, m), 3.92-3.70(1 3H, m), 3.60-3.23(8H, m), 3.07-3.05(1 H, m), 2.75-2.7
 0(1 H, m), 2.43-2.39(1 H, m), 2.19-2.16(3H, m), 1.73-1.48(6H, m), 0.98-0.96(3H,

m), 0.83-0.81 (3H, m), 0.71-0.65 (4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 1088(M+H)⁺

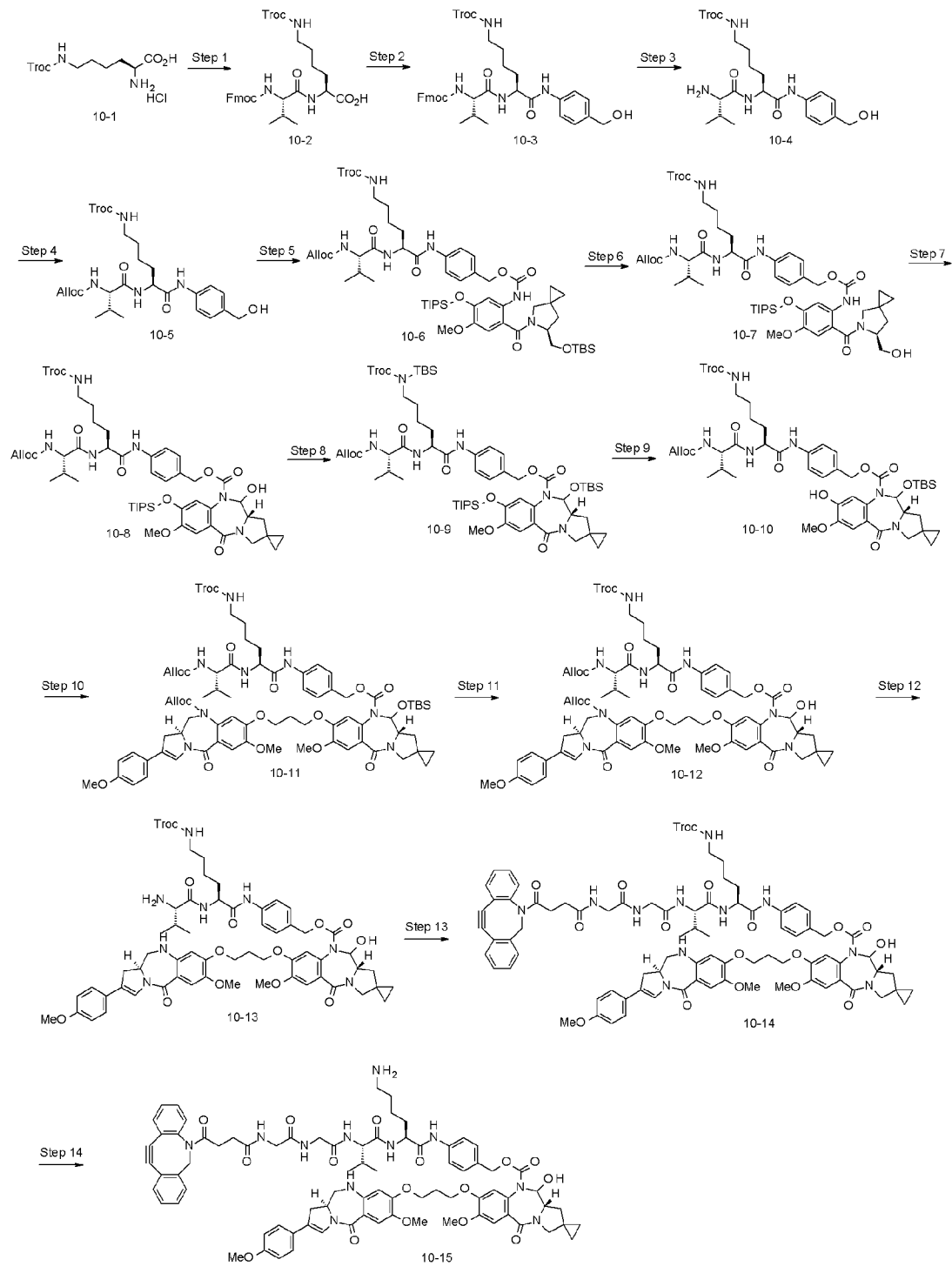
[0387] 工程9: N-[4-((11,12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-
 -イル)-4-オキソプタノイル)グリシルグリシル-L-バリル-N₅-カルバ
 モイル-N-{4-[(11a'-S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-
 8'-((3-{[(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-
 オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベン
 ゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-1Γ,11a
 '-ジヒドロ-ΓH-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c]
 [1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)
 メチル]フェニル}-L-オルニチンアミド

上記工程8にて得られた化合物 (0.0347g, 0.0319mmol) を、実施例3工程13
 と同様に反応させ、目的物 (0.00650g, 14%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1489(M+H)⁺

[0388] 実施例10: 薬物リンカー8

[化 134]



工程 1 : N₆- [(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] -L-バリン
 ル-N₆- [(2,2,2-トリクロロエトキシ) カルボニル] -L-リシン

出発物質 10-1 (2.78g, 7.75mmol) Bioscience, Biotechnology, and Bio

chemistry 2012, 76, 205) の 1, 2-ジメトキシエタン (30mL)、水 (30mL)、THF (15mL) 溶液に炭酸水素ナトリウム (1.30g, 15.5mmol)、2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル-N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル]-L-バリン-1-トリブト (3.39g, 7.76mmol) を室温にて加えた。反応溶液を室温にて五日間撹拌した後、クロロホルムとメタノール混合液 (10 : 1, v/v) で抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、減圧留去した。得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄し固体を濾去した。濾液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 30 : 70 (v/v) ~ 0 : 100 (v/v)] にて精製し、目的物 (2.13g, 43%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.78-7.76(2H, m), 7.60-7.58(2H, m), 7.41-7.39(2H, m), 7.32-7.30(2H, m), 6.85-6.83(1H, m), 5.58-5.56(1H, m), 5.32-5.30(1H, m), 4.72-4.57(3H, m), 4.46-4.34(2H, m), 4.23-4.21(1H, m), 4.05-4.03(1H, m), 3.22-3.15(2H, m), 2.06-1.88(3H, m), 1.52-1.51(2H, m), 1.40-1.38(2H, m), 0.97-0.96(6H, m).

MS(APCI, ESI)m/z : 642(M+H)⁺

[0389] 工程2: N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル]-L-バリン-N-[4-(ヒドロキシメチル) フェニル]-N⁶-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニル]-L-リシンアミド

上記工程1にて得られた化合物 (2.11g, 3.29mmol) を、実施例5工程2と同様に反応させ、得られた化合物 (2.24g, 91%) をそのまま次の反応に用いた。

[0390] 工程3: L-バリン-N-[4-(ヒドロキシメチル) フェニル]-N⁶-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニル]-L-リシンアミド

上記工程2にて得られた化合物 (2.24g, 3.00mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (20mL) 溶液にピペリジン (0.5934mL, 5.994mmol) を室温にて加え、室温にて1時間撹拌した。減圧留去し、得られた残渣 (1.576g, 定量的) をそのまま次の反応に用いた。

[0391] 工程4: N-[(プロパ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル]-L-バリン-N-[4-(ヒドロキシメチル) フェニル]-N⁶-(2, 2, 2-トリクロロ

エトキシ)カルボニル]—L—リシンアミド

上記工程3にて得られた化合物 (1. 58g, 3. 00mmol) を、実施例7工程1と同様に反応させ、得られた化合物 (1. 50g, 82%) をそのまま次の反応に用いた。

[0392] 工程5 : N— [(プロポ_2_ エン—1_ イルオキシ)カルボニル] _L_ バリル-N- [4- ({ [(2- { [(6S) -6- ({ [tert - プロチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) _5_ アザスピロ [2. 4] ヘプト_5_ イル] カルボニル} _4—メトキシ—5_ { [トリ (プロパン_2_ イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバモイル] オキシ} メチル) フェニル] _N6_ [(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニル]—L—リシンアミド

上記工程4にて得られた化合物 (1. 57g, 2. 57mmol) を、実施例1工程6と同様に反応させ、目的物 (1. 691g, 71%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9. 04-9. 02(1 H, m), 8. 48-8. 45(1 H, m), 7. 81(1H, s), 7. 55-7. 53(2 H, m), 7. 35-7. 33(2H, m), 6. 76(1 H, s), 6. 68-6. 66(1 H, m), 5. 94-5. 86(1 H, m), 5. 32-5. 23(4H, m), 5. 14-5. 10(2H, m), 4. 79-4. 76(1 H, m), 4. 69-4. 67(1 H, m), 4. 57-4. 54(4H, m), 4. 03-4. 02(2H, m), 3. 75-3. 72(5H, m), 3. 29-3. 22(2H, m), 3. 04-3. 02(1 H, m), 2. 27-2. 01(4H, m), 1. 83-1. 58(3H, m), 1. 46-1. 44(2H, m), 1. 31-1. 27(3H, m), 1. 11-1. 09(18H, m), 1. 00-0. 90(15H, m), 0. 65-0. 48(4H, m), 0. 06-0. 03(6H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 1219(M+Na)⁺

[0393] 工程6 : N— [(プロポ_2_ エン—1_ イルオキシ)カルボニル] _L_ バリル _N_ [4- ({ [(2- { [(6S) -6- (ヒドロキシメチル) _5_ アザスピロ [2. 4] ヘプト—5_ イル] カルボニル} _4—メトキシ—5_ { [トリ (プロパン_2_ イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバモイル] オキシ} メチル) フェニル] _N6_ [(2, 2, 2—トリクロロエトキシ)カルボニル] _L_ -リシンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (1. 69g, 1. 41mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (1. 43g, 94%)

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8. 57-8. 52(2H, m), 7. 70(1 H, s), 7. 56-7. 54(2 H, m), 7. 35-7. 33(2

H, m), 6.76-6.75(2H, m), 5.91-5.90(1 H, m), 5.40-5.26(4H, m), 5.12(2H, s), 4.78-4.75(1 H, m), 4.69-4.66(1 H, m), 4.58-4.55(4H, m), 4.37-4.34(1 H, m), 4.04-4.02 (1H, m), 3.80-3.77(5H, m), 3.65-3.62(1 H, m), 3.28-3.11(3H, m), 2.13-2.04(2H, m), 1.81-1.78(3H, m), 1.60-1.58(2H, m), 1.45-1.43(2H, m), 1.33-1.25(3H, m), 1.11-1.09(18H, m), 0.98-0.94(6H, m), 0.58-0.51(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 1083(M+H)⁺

[0394] 工程7: N₆ [(プロポ₂ エン-1-イルオキシ) カルボニル] _L バリル-N⁶ {4 [({ [(11a, S) - 11' - ヒドロキシ-7' - メトキシ-5' - オキソ-8' - { [トリ (プロパン₂ イル) シリル] オキシ} - 11' , 11a' - ジヒドロ-Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' - ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - N⁶ [(2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニル] -L- リシンアミド

上記工程6にて得られた化合物 (1.43g, 1.32mmol) を、実施例9工程3と同様に反応させ、目的物 (0.714g, 50%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.49-8.46(1 H, m), 7.52-7.45(2H, m), 7.19-7.18(3H, m), 6.72-6.68(2H, m), 5.90-5.87(2H, m), 5.33-5.23(4H, m), 5.10-5.07(1 H, m), 4.98-4.95(1 H, m), 4.78-4.76(1 H, m), 4.69-4.66(1 H, m), 4.58-4.53(3H, m), 4.01 (1H, s), 3.83-3.81(4H, m), 3.73-3.70(1 H, m), 3.57-3.55(2H, m), 3.29-3.25(3H, m), 2.42-2.39 (1H, m), 2.15-2.13(1 H, m), 2.03-2.01(2H, m), 1.74-1.71(2H, m), 1.44-1.42(2H, m), 1.23-1.17(3H, m), 1.03-0.93(24H, m), 0.67-0.64(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z : 1081(M+H)⁺

[0395] 工程8: N₆ [(プロポ₂ エン-1-イルオキシ) カルボニル] _L バリル-N⁶ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] _N {4 [({ [(11a' S) - 1Γ - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7' - メトキシ-5' , -オキソ-8' - { [トリ (プロパン₂ イル) シリル] オキシ} - 11' , 11a' - ジヒドロ-Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' - ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキ

シ) メチル] フエニル} - N⁶- [(2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニル] -L- リシンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0.714g, 0.660mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (0.476g, 60%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.63-8.51 (1H, m), 7.49-7.48 (2H, m), 7.18-7.14 (3H, m), 6.61-6.53 (2H, m), 5.99-5.94 (2H, m), 5.33-5.17 (4H, m), 4.81-4.78 (3H, m), 4.59-4.57 (3H, m), 4.03-4.01 (1H, m), 3.88-3.85 (4H, m), 3.70-3.67 (2H, m), 3.50-3.47 (1H, m), 3.24-3.17 (3H, m), 2.37-2.34 (1H, m), 2.13-2.07 (2H, m), 1.59-1.54 (3H, m), 1.38 (2H, s), 1.16-0.92 (35H, m), 0.81-0.76 (9H, m), 0.67-0.64 (4H, m), 0.34-0.31 (6H, m), 0.19 (3H, s), 0.09 (3H, s).

[0396] 工程9: N⁶- [(プロポ₂ エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L- バリル - N⁶- [tert - プチル (ジメチル) シリル] -N⁶- {4- [({ [(11' S, 11a', S) - 11' - { [tert - プチル (ジメチル) シリル] オキシ} -8' - ヒドロキシ-7' - メトキシ-5' - オキソ-11' , 11a' - ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フエニル} - N⁶- [(2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニル] -L- リシンアミド

上記工程8にて得られた化合物 (0.476g, 0.398mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0.283g, 68%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.48 (1H, s), 7.51-7.47 (2H, m), 7.25-7.24 (2H, m), 7.12-7.10 (2H, m), 6.70-6.67 (2H, m), 6.09-6.07 (1H, m), 5.98-5.92 (2H, m), 5.33-5.20 (5H, m), 4.82-4.71 (3H, m), 4.59-4.56 (3H, m), 4.03-4.00 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.72-3.69 (1H, m), 3.54-3.52 (1H, m), 3.28-3.25 (3H, m), 2.37-2.34 (1H, m), 2.18-2.16 (1H, m), 2.05-1.99 (1H, m), 1.78-1.75 (1H, m), 1.56-1.53 (2H, m), 1.43-1.41 (2H, m), 0.98-0.94 (6H, m), 0.82-0.75 (9H, m), 0.67-0.64 (4H, m), 0.19 (3H, s), 0.10 (3H, s).

MS(APCI, ESI)m/z: 1039(M+H)⁺

[0397] 工程10: N⁶- [(プロポ₂ エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L- バリル - N⁶- {4- [({ [(11a' S) - 11' - { [tert - プチル (ジメチル) シ

リル] オキシ} _7' —メトキシ-8' - [3- ({ (11aS) _7—メトキシ_2
 - (4—メトキシフェニル) _5_ オキソ_10_ [(プロプ-2—エン_1—イ
 ルオキシ) カルボニル] _5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ-1H—ピロロ [2,
 1-c] [1, 4] ベンジアゼピン-8—イル} オキシ) プロボキシ] _5' —オ
 キソ-1Γ, 11a' —ジヒドロ_Γ H_スピロ [シクロプロパン-1, 2' —ピ
 ロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボ
 ニル} オキシ) メチル] フェニル} - N⁶- [(2, 2, 2—トリクロロエトキシ
) カルボニル] —L—リシンアミド

上記工程9にて得られた化合物 (0. 119g, 0. 114mmol) を、実施例4工程9
 と同様に反応させ、目的物 (0. 134g, 77%) を得た。

[0398] 工程11 :N- [(プロプ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニル] —L—バリ
 ル_N_ {4_ [({ [(11a' S) - 11' —ヒドロキシ-7' —メトキシ-8'
 - [3- ({ (11aS) _7—メトキシ-2_ (4—メトキシフェニル) _5—オキ
 ソ_10_ [(プロプ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニル] _5, 10, 11,
 11a—テトラヒドロ-1H_ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_
 イル} オキシ) プロボキシ] —5' —オキソ-11', 11a' —ジヒドロ-1' H
 —スピロ [シクロプロパン-1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジ
 アゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル
 } - N⁶- [(2, 2, 2—トリクロロエトキシ) カルボニル] —L—リシンアミド

上記工程10にて得られた化合物 (0. 134g, 0. 0881 mmol) を、実施例3工程
 11と同様に反応させ、目的物 (0. 120g, 97%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1423(M+Na) +

[0399] 工程12 :L—バリル—N_ {4_ [({ [(11a, S) —11' —ヒドロキシ_7'
 —メトキシ-8' - (3- { [(11aS) _7—メトキシ-2_ (4—メトキシフェ
 ニル) _5_ オキソ_5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ-1H—ピロロ [2, 1- c
] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_ イル] オキシ} プロボキシ) _5' —オキ
 ソ-1Γ, 11a' —ジヒドロ_Γ H_スピロ [シクロプロパン-1, 2' —ピロ
 ロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニ

ル オキシ チル フェ ル (2, 2, リクロ キシ

カルボニル]—リーリシニアミド

上記 程11にて得 る化合物 12 を、実 工程 2と同 (i) 応 的 を得 /

¹ H-NMR (δ)	2	7.2	2 (2H)	(1	5 5 (1H	5 (m), 4.73-4.4	m
	1.5 (2H)	4-3	1.5	2 (1	2 (4		
	0 (4	23					

[0400] 工程13: N—[4—(11, 12-ジフェニロジベンゾ [b, f] アゾシネ-5 (6H) —イル) —4-オキソゾタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N—{4

(13a') —1' —ヒ コキシ , キシ ,
 —メ キシ 2 (4 フシフ ル 5 オキソ 5 10,
 11, 11a-チトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼリン
 —8-イル] オキシ} フロボキシ) —5' —オキノ-11' , 11a' —ジヒドロ
 1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾ
 ジアゼリン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニ
 ル} —N₆— [(2, 2, 2-トリクロエトキシ) カルボニル] —リーリシニアミ
 ド

上記 化合物 5 mm を、実 工

程 2と同 (i) 的 を得 / 0721g, 7% を得 /

[0401] 工程14: N—[4—(11, 12-ジフェニロジベンゾ [b, f] アゾシネ-5 (6H) —イル) —4-オキソゾタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N—{4—
 (11a') —1' —ヒ コキシ , キシ ,
 —メ キシ 2 (4 フシフ ル 5 オキソ 5

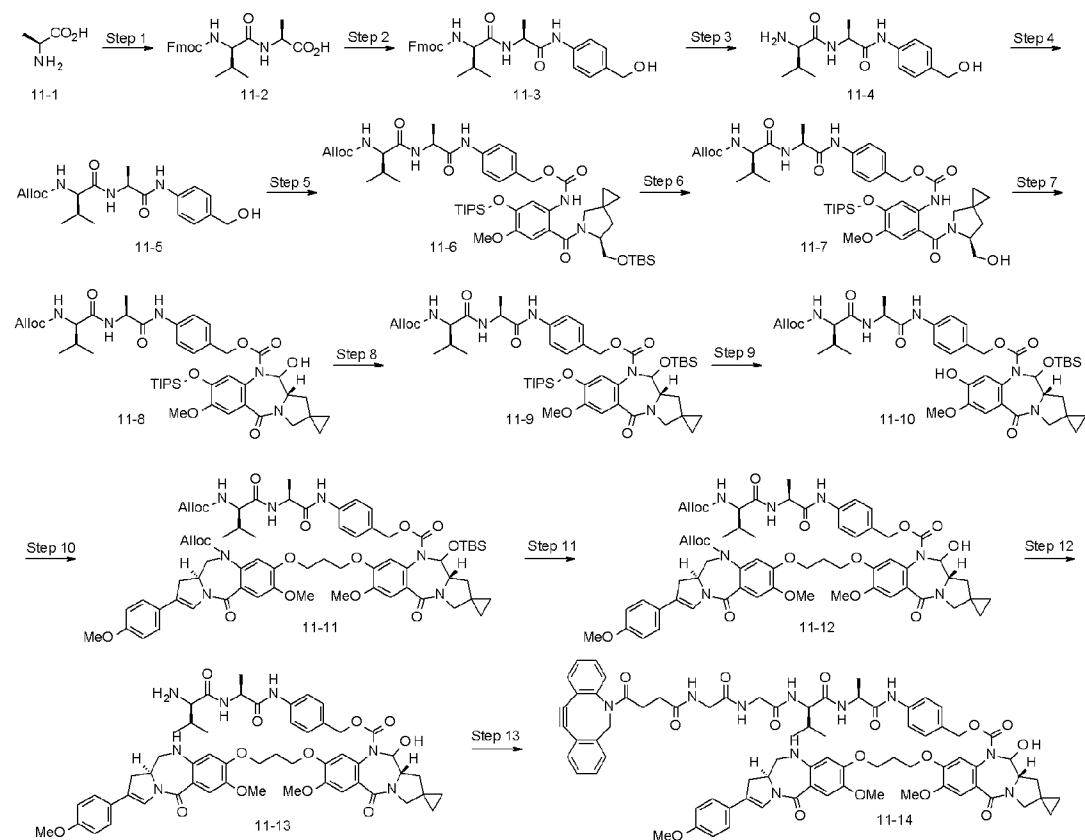
, 11a—テトラヒドロ—1H_ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン—8—イル]オキシ}プロボキシ)—5'—オキソ—11', 11a'—ジヒドロ—1'H—スピロ[シクロプロパン—1,2'—ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]—10' (5' H)—イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}—L—リシンアミド

上記工程13より得られた化合物 (0.0721 g, 0.0441 mmol) を、実施例21工程6と同様に反応させ、目的物 (0.0348g, 54%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1460(M+H) +

[0402] 実施例11 : 薬物リンカー9

[化135]



工程1 : N_ [(9H—フルオレン_9_イルメトキシ)カルボニル]—D—バリン—L—アラニン

L—アラニン (0.0721 g, 0.0441 mmol) を、2,5—ジオキソピロリジン—1—イル N_ [(9H—フルオレン_9_イルメトキシ)カルボニル]—L—バリン

ネー トの代 わ り に 2, 5—ジ オ キ ソ ピ ロ リ ジ ン—1—イ ル N— [(9H—フル オ
レ ン_9_ イ ル メ ト キ シ) カ ル ボ ニ ル] —D—バ リ ネー ト (0. 528g , 5. 92mmo
l) を 用 い て、 実 施 例 10工 程 1と 同 様 に 反 応 さ せ た。 得 ら れ た 化 合 物 (0. 0348
g , 54%) は そ の ま ま 次 の 反 応 に 用 い た。

¹H-NMR(CDMSO-D₆) δ : 10. 55(1 H, s), 8. 23-8. 21 (1H, m), 7. 91-7. 89(2H, m), 7. 76-7. 7
5(2H, m), 7. 42-7. 40 (3H, m), 7. 33-7. 31(2H, m), 4. 31-4. 20 (4H, m), 3. 93-3. 91 (1H,
m), 1. 97-1. 93(1 H, m), 1. 27-1. 25(3H, m), 0. 86-0. 84(6H, m) .

MS(APCI、ESI)m/z : 411 (M+H)⁺

[0403] 工 程 2 : N— [(9H—フル オ レ ン_9_ イ ル メ ト キ シ) カ ル ボ ニ ル] —D—バ リ
ル_N— [4- (ヒ ド ロ キ シ メ チ ル) フ エ ニ ル] —L—ア ラ ニ ン ア ミ ド

上 記 工 程 1に て 得 ら れ た 化 合 物 (2. 05g, 4. 99mmo l) を、 実 施 例 5工 程 2と 同 様
に 反 応 さ せ、 得 ら れ た 化 合 物 (2. 19g, 85%) を そ の ま ま 次 の 反 応 に 用 い た。

[0404] 工 程 3 : D—バ リ ル —N— [4- (ヒ ド ロ キ シ メ チ ル) フ エ ニ ル] —L—ア ラ ニ ン
ア ミ ド

上 記 工 程 2に て 得 ら れ た 化 合 物 (2. 19g, 4. 25mmo l) を、 実 施 例 10工 程 3と 同
様 に 反 応 さ せ、 得 ら れ た 化 合 物 (0. 966g, 76%) を そ の ま ま 次 の 反 応 に 用 い た
。

[0405] 工 程 4 : N— [(プ ロ プ_2_ エ ン—1_ イ ル オ キ シ) カ ル ボ ニ ル] _D_ バ リ ル
-N- [4- (ヒ ド ロ キ シ メ チ ル) フ エ ニ ル] —L—ア ラ ニ ン ア ミ ド

上 記 工 程 3に て 得 ら れ た 化 合 物 (0. 966g , 3. 29mmo l) を、 実 施 例 7工 程 1と
同 様 に 反 応 さ せ、 得 ら れ た 化 合 物 (1. 11g , 89%) を そ の ま ま 次 の 反 応 に 用
い た。

[0406] 工 程 5 : N— [(プ ロ プ_2_ エ ン—1_ イ ル オ キ シ) カ ル ボ ニ ル] _D_ バ リ ル
-N- [4- ({ [(2- { [(6S) -6- ({ [tert - プ チ ル (ジ メ チ ル) シ
リ ル] オ キ シ } メ チ ル) _5_ ア ザ ス ピ ロ [2. 4] ヘ プ ト_5_ イ ル] カ ル ボ
ニ ル } _4—メ ト キ シ—5_ { [ト リ (プ ロ バ ン_2_ イ ル) シ リ ル] オ キ シ }
フ エ ニ ル) カ ル バ モ イ ル] オ キ シ } メ チ ル) フ エ ニ ル] —L—ア ラ ニ ン ア ミ ド

上 記 工 程 4に て 得 ら れ た 化 合 物 (1. 11g , 2. 93mmo l) を、 実 施 例 1工 程 6と

同様に反応させ、目的物 (1. 75g, 80%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9.02(1 H, s), 8.55(1 H, s), 7.81(1H, s), 7.57-7.54(2H, m), 7.34-7.32(2H, m), 6.76(1 H, s), 6.52-6.50(1 H, m), 5.91-5.86(1 H, m), 5.30-5.22(3H, m), 5.13-5.10(2H, m), 4.65-4.59(4H, m), 3.99-3.97(1 H, m), 3.87-3.85(1 H, m), 3.75-3.72(5H, m), 3.04-3.02(1 H, m), 2.28-2.13(2H, m), 1.70-1.68(1 H, m), 1.49-1.47(3H, m), 1.31-1.27(3H, m), 1.11-1.09(1 8H, m), 1.00-0.90(1 5H, m), 0.65-0.48(4H, m), 0.06-0.03(6H, m). MS(APCI, ESI)m/z : 966(M+H)⁺

[0407] 工程6 : N₁ [(プロポ₂ エン-1₁ イルオキシ) カルボニル]₁D₁ バリル-N₁ {4₁ ({ [(2₁ { [(6S) -6₁ (ヒドロキシメチル)]₁5-アザスピロ [2. 4] ヘプト₅ イル] カルボニル }]₁4-メトキシ-5₁ { [トリ (プロパン₂ イル) シリル] オキシ } フェニル) カルバモイル] オキシ } メチル) フェニル] -L-アラニンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (1. 75g, 1. 81mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (1. 53g, 99%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.66(1 H, s), 8.50(1 H, s), 7.69(1 H, s), 7.57-7.54(2H, m), 7.34-7.32(2H, m), 6.75-6.71(2H, m), 5.90-5.85(1 H, m), 5.40-5.38(1 H, m), 5.29-5.21(2H, m), 5.12(2H, s), 4.71-4.50(4H, m), 4.34-4.31(1H, m), 3.89-3.77(6H, m), 3.64-3.61(1H, m), 3.13-3.10(1 H, m), 2.17-2.09(1 H, m), 1.87-1.84(2H, m), 1.48-1.46(3H, m), 1.32-1.28(3H, m), 1.11-1.09(1 8H, m), 0.97-0.94(6H, m), 0.63-0.49(4H, m).

MS(APCI, ESI)m/z : 852(M+H)⁺

[0408] 工程7 : N₁ [(プロポ₂ エン-1₁ イルオキシ) カルボニル]₁D₁ バリル-N₁ {4₁ [({ [(1Γ S, 11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-8' - { [トリ (プロパン₂ イル) シリル] オキシ } -11, 11a' -ジヒドロ-Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル } オキシ) メチル] フェニル }]₁-L-アラニンアミド

上記工程6にて得られた化合物 (1. 53g, 1. 79mmol) を、実施例9工程3と

同様に反応させ、目的物 (1. 24g, 81%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8. 51 (1H, s), 7. 51-7. 49(2H, m), 7. 18-7. 15(3H, m), 6. 65(1 H, s), 6. 56-6. 54(1 H, m), 5. 90-5. 85(2H, m), 5. 31-5. 19(3H, m), 5. 10-5. 07(1 H, m), 4. 97-4. 94(1 H, m), 4. 67-4. 50 (3H, m), 3. 90-3. 88(1 H, m), 3. 84(3H, s), 3. 73-3. 70(1 H, m), 3. 58-3. 56(2H, m), 3. 31-3. 28(1 H, m), 2. 42-2. 39(1 H, m), 2. 18-2. 15(1 H, m), 1. 74-1. 71 (1H, m), 1. 48-1. 46(3H, m), 1. 19-0. 88(27H, m), 0. 69-0. 65(4H, m) .

MS(APCI、ESI)m/z :850(M+H) +

[0409] 工程8 : N₂ [(プロポ₂ エン-1₂ イルオキシ) カルボニル] _D バリル-N- {4₂ [({ [(11a, S) -11'] - { [tert₂ プチル (ジメチル) シリル] オキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-8' - { [トリ (プロパン₂ イル) シリル] オキシ} - 11' , 11a' -ジヒドロ₂ Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5, H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (1. 24g, 1. 45mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 979g, 70%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8. 48(1 H, s), 7. 51-7. 49(2H, m), 7. 19(1 H, s), 7. 14-7. 12(2H, m), 6. 62(1 H, s), 6. 53-6. 51 (1H, m), 6. 01-5. 99(1 H, m), 5. 91-5. 85(1 H, m), 5. 30-5. 28 (2H, m), 5. 21-5. 15(2H, m), 4. 82-4. 79(1 H, m), 4. 68-4. 51(3H, m), 3. 88-3. 84 (4H, m), 3. 71-3. 69(1 H, m), 3. 50-3. 47(1 H, m), 3. 28-3. 25(1 H, m), 2. 37-2. 34(1 H, m), 2. 20-2. 13(1 H, m), 1. 52-1. 47 (4H, m), 1. 21-0. 94(27H, m), 0. 80-0. 77(9H, m), 0. 67-0. 64(4H, m), 0. 19(3H, s), 0. 08(3H, s) .

MS(APCI、ESI)m/z :964(M+H) +

[0410] 工程9 : N₂ [(プロポ₂ エン-1₂ イルオキシ) カルボニル] _D バリル-N- {4₂ [({ [(11a, S) -11'] - { [tert₂ プチル (ジメチル) シリル] オキシ} -8' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-11' , 11a, -ジヒドロ₂ Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5, H) -イル] カルボニル} オキシ)

メチル} フェニル} —L—アラニンアミド

上記工程8にて得られた化合物 (0.979g, 1.02mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0.769g, 94%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.71(1H, s), 7.37-7.35(2H, m), 7.23(1H, s), 7.04-7.02(2H, m), 6.86-6.84(1H, m), 6.74-6.72(1H, m), 6.65(1H, s), 6.05-5.85(2H, m), 5.64-5.62(1H, m), 5.32-5.20(3H, m), 4.82-4.78(1H, m), 4.70-4.52(3H, m), 4.00-3.98(1H, m), 3.93-3.90(3H, m), 3.73-3.70(1H, m), 3.55-3.53(1H, m), 3.27-3.23(1H, m), 2.38-2.18(2H, m), 1.60-1.46(4H, m), 1.00-0.92(6H, m), 0.80(9H, s), 0.68-0.63(4H, m), 0.20(3H, s), 0.10(3H, s).

MS(APCI, ESI)m/z : 808(M+H)⁺

[041 1] 工程10 : N- [(プロポ_2_エン) _1_イルオキシ) カルボニル] _D—バリル_N_ {4_ [({ [(11a' S) - 11' - { [tert _プチル (ジメチル) シリル] オキシ} —7' —メトキシ_8' - [3- ({ (11aS) _7—メトキシ-2- (4—メトキシフェニル) _5_ オキソ—10— [(プロポ_2_エン—1_イルオキシ) カルボニル] _5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル} オキシ) プロボキシ] _5' —オキソ—11', 11a' —ジヒドロ_11' H_スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル} フェニル} —L—アラニンアミド

上記工程9にて得られた化合物 (0.100g, 0.124mmol) を用いて、実施例4工程9と同様に反応させ、目的物 (0.148g, 94%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 1284(M+H)⁺

[041 2] 工程11 : N- [(プロポ_2_エン—1_イルオキシ) カルボニル] —D—バリル_N_ {4_ [({ [(11a' S) - 11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' - [3- ({ (11aS) _7—メトキシ—2_ (4—メトキシフェニル) _5—オキソ_10_ [(プロポ_2_エン—1_イルオキシ) カルボニル] _5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_イル} オキシ) プロボキシ] —5' —オキソ—11', 11a' —ジヒドロ—1' H

ースピロ [シクロプロパン-1, 2' -スピロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] カルボニル {オキシ} メチル] フェニル

ンアミド

↓

上 14 g, mm 用 、 実

3工程11と同様に反応させ、目的物 (0. 132g, 98%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:1170(M+H)⁺

[0413] 工程12: D-バピル-N- {4- [({ (11a' S) -11' -ヒドロキシ-7'

-メトキシ-8' - (3- { [(11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェ

ニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-チトラヒドロ-1H-ピロ [2, 1-c

] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ) -5' -オキ

ソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -スピロ

ロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニ

ル} オキシ} メチル] フェニル} -ル-アミド

上記工程11にて得られた化合物 (0. 132g, 0. 113mmol) を用いて、実施例

3工程12と同様に反応させ、目的物 (0. 0963g, 85%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 9. 12(1H, s), 7. 85-7. 84(1H, m), 7. 54-7. 52(1H, m), 7. 49(1H, s),

7. 44-7. 42(2H, m), 7. 34-7. 32(2H, m), 7. 21(1H, s), 7. 13-7. 11(2H, m), 6. 90-6. 88(

2H, m), 6. 41(1H, s), 6. 10(1H, s), 5. 90-5. 87(1H, m), 5. 35-5. 32(1H, m), 4. 74-4. 71

(1H, m), 4. 60-4. 56(2H, m), 4. 30(1H, s), 4. 13-4. 10(4H, m), 3. 89(3H, s), 3. 83(3H,

s), 3. 80(3H, s), 3. 74-3. 71(1H, m), 3. 60-3. 49(4H, m), 3. 39-3. 35(1H, m), 3. 31-3.

27(2H, m), 2. 75-2. 72(1H, m), 2. 44-2. 18(4H, m), 1. 78-1. 44(6H, m), 0. 98-0. 97(3H

, m), 0. 74-0. 68(7H, m).

MS(APCI、ESI)m/z:1002(M+H)⁺

[0414] 工程13: N- {4- (11, 12-ジヒドロ-1H-ピロ [b, f] アゾシン-5 (6H)

-イル) -4-オキソ-2-イル] アリシラ-2-イル-N- {4-

[({ (11a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(

11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11

, 11a-チトラヒドロ-1H-ピロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8

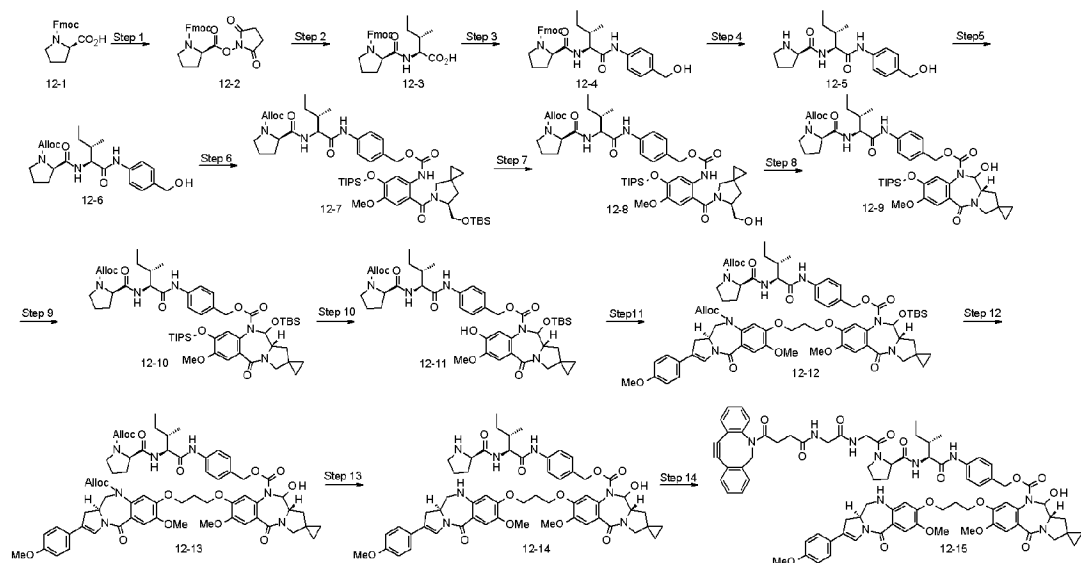
—イル} オキシ} プロボキシ) - 5' - オキソ-11' , 11a' - ジヒドロ-1'
 H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジ
 アゼピン] - 10' (5' H) -イル} カルボニル} オキシ) メチル} フェニル
 } -L-アラニンアミド

上記工程 12 にて得られた化合物 (0. 0455g, 0. 0454mmol) を用いて、実施
 例 3 工程 13 と同様に反応させ、目的物 (0. 0416g, 65%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1403(M+H)⁺

[0415] 実施例 12 : 薬物リンカー 10

[化 136]



工程 1 : 化合物 12-2

出発物質 12-1 (2. 01g, 5. 94mmol) のジクロロメタン (50ml) に 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 (1. 37g, 7. 1
 3mmol) を室温にて加え、室温にて 10 分 攪拌 した後、0℃にて N-ヒドロキシス
 クシイミド (0. 821g, 7. 13mmol) を加えた。反応溶液を室温にて一晩攪拌
 した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣に酢酸エチル、水を加え、有機
 層を水、10% クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水
 で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去した後、得られた残渣をシ
 リカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 90 : 10 (v/v

) へ50 : 50 (v/v)] にて精製し、目的物 (2. 11g , 82%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :435(M+H) ⁺

[041 6] 工程2 :化合物 12-3

上記工程1にて得られた化合物 (2. 11g , 4. 85mmol) を、N⁶- [(2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニル] -L-リシン塩酸塩の代わりにL-イソロイシンを用いて、実施例10工程1と同様に反応させ、目的物 (2. 16g , 99%) を得た。MS(APCI、ESI)m/z :451 (M+H) ⁺

[041 7] 工程3 :化合物 12-4

上記工程2にて得られた化合物 (2. 16g , 4. 85mmol) を、実施例5工程2と同様に反応させ、目的物 (1. 48g, 56%) を得た。

[041 8] 工程4 :化合物 12-5

上記工程3にて得られた化合物 (1. 48g, 2. 67mmol) を、実施例10工程3と同様に反応させ、目的物 (0. 794g, 89%) を得た。

[041 9] 工程5 :化合物 12-6

上記工程3にて得られた化合物 (0. 794g , 2. 38mmol) を、実施例7工程1と同様に反応させ、目的物 (0. 886g , 89%) を得た。

[0420] 工程6 :化合物 12-7

上記工程5にて得られた化合物 (0. 794g , 2. 12mmol) を、実施例1工程6と同様に反応させ、目的物 (1. 19g , 72%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :1006(M+H) ⁺

[0421] 工程7 :化合物 12-8

上記工程6にて得られた化合物 (1. 19g , 1. 18mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (1. 07g, 定量的) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :892(M+H) ⁺

[0422] 工程8 :化合物 12-9

上記工程7にて得られた化合物 (1. 18mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (0. 800g, 76%) を得た。MS(APCI、ESI)m/z :890(M+H) ⁺

[0423] 工程9 :化合物 12-10

上記工程8にて得られた化合物 (0. 800g, 0. 899mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 567g, 90%) を得た。

MS(APCI, ESI) m/z : 1004(M+H)⁺

[0424] 工程10: 化合物12-11

上記工程9にて得られた化合物 (0. 567g, 0. 564mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0. 454g, 94%) を得た。

MS(APCI, ESI) m/z : 848(M+H)⁺

[0425] 工程11: 化合物12-12

上記工程10にて得られた化合物 (0. 100g, 0. 118mmol) を、実施例4工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 159g, 定量的) を得た。

MS(APCI, ESI) m/z : 1324(M+H)⁺

[0426] 工程12: 化合物12-13

上記工程11にて得られた化合物 (0. 118mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0. 139g, 97%) を得た。

MS(APCI, ESI) m/z : 1210(M+H)⁺

[0427] 工程13: 化合物12-14

上記工程12にて得られた化合物 (0. 139g, 0. 114mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0. 139g, 97%) を得た。

¹ H-NMR (CDCl ₃) δ	22 (1H)	2 (2H)	5 (1H)	3 (2H)	7 (2H)	4 (1H)	2 (2H)	1 (1H)
7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1	7. 7, 7. 4 (4H), 5. 5-7. 4 (4H), 2. 2, 1. 1, -1. 1

ESI) m/z : 1042(M+H)⁺

[0428] 工程14: N- [4- (11, 12-ジチロロジベンゾ [b, f] フゾシン-5 (6H) -イリル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-D-プロリン-N- {4 (11a) } -ヒトコキシ 7' トコキシ

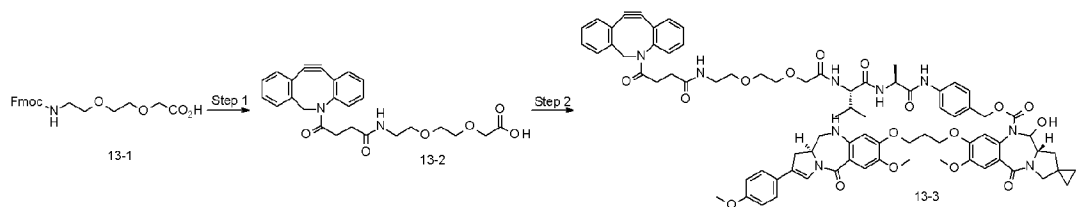
(11aS) _7-メトキシ-2_ (4-メトキシフェニル) _5_ オキソ_5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H_ピロロ[2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン _8_ イル] オキシ} プロボキシ) -5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-Γ H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-イソロイシンアミド

上記工程13にて得られた化合物 (0.0314g, 0.0301 mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.0300g, 69%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1443(M+H) +

[0429] 実施例13 : 薬物リンカー11

[化137]



工程1 : [2_ (2- { [4- (11, 12_ ジデヒドロベンゾ [b, f] アゾシン -5 (6H) -イル) _4-オキソプタノイル] アミノ} エトキシ) エトキシ] 酢酸

出発物質13-1 (3.00g, 7.78mmol, 東京化成工業株式会社) のN, N-ジメチルホルムアミド (10mL) 溶液に、室温にて1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] _7_ ウンデセン (1.16mL, 7.78mmol) を加え、室温にて2時間攪拌した後、室温にて1_ { [4- (11, 12_ ジデヒドロベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) _4-オキソプタノイル] オキシ} ピロリジン-2, 5-ジオン (1.10g, 2.72mmol) 、 トリエチルアミン (1.94mL, 14.0mmol) を加えた。反応溶液を減圧留去した後、得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 100 : 0 (v/v) → クロロホルム : メタノール = 90 : 10 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.410g, 12%) を得た。
¹H-NMR(CDC₃Cl₂) δ : 7.68-7.66(1 H, m), 7.55-7.53(1 H, m), 7.44-7.24(6H, m), 6.58-6

. 56(1 H, m), 5. 16-5. 12(1 H, m), 4. 16-4. 11(2H, m), 3. 80-3. 57(5H, m), 3. 48-3. 44(2 H, m), 3. 30-3. 18(2H, m), 2. 90-2. 86(1 H, m), 2. 52-2. 45(1 H, m), 2. 26-2. 22(1 H, m), 2. 02-1 . 98(1 H, m) .

MS(APCI、ESI)m/z :451 (M+H)⁺

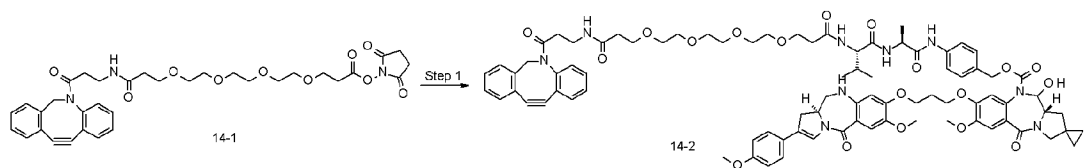
[0430] 工程2 : N_ { [2- (2- { [4- (11, 12_ ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) - 4-オキソプタノイル] アミノ} エトキシ) エトキシ] アセチル} -L-バリル-N- {4_ [({ [(11a, S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11aS) - 7-メトキシ-2_ (4-メトキシフェニル) _5_ オキソ_ 5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_ イル] オキシ} プロボキシ) _5' -オキソ-1Γ, 11a' -ジヒドロ_ Γ H_ スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

上記工程1にて得られた化合物 (0. 050g, 0. 0499mmol) を、実施例3工程1と同様に反応させ、目的物 (0. 0590g, 82%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1434(M+H)⁺

[0431] 実施例14 : 薬物リンカー12

[化138]



工程1 : N_ [20- (11, 12_ ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) - 16, 20-ジオキソ_ 4, 7, 10, 13-テトラオキサ-17-アザイコサン-1_ オイル] -L-バリル-N- {4_ [({ [(11a, S) -11, -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11aS) - 7-メトキシ-2_ (4-メトキシフェニル) _5_ オキソ_ 5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_ イル] オキシ} プロボキシ) }

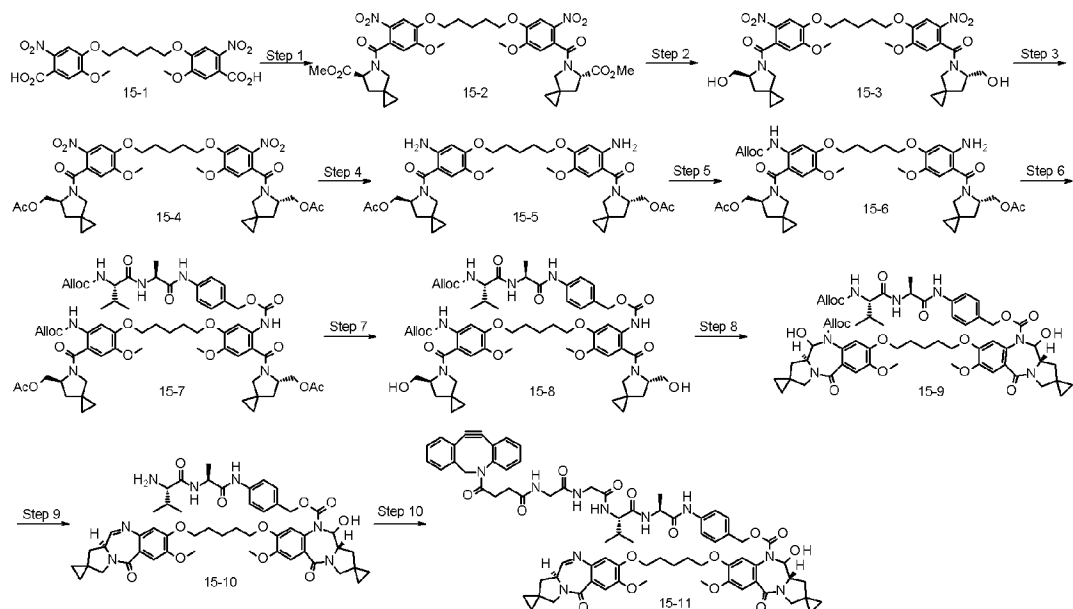
5'-オキソ-1H-11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

実施例4工程11にて得られた化合物 (0.0500g, 0.0499mmol)、出発物質 14-1 (0.050g, 0.0499mmol) し Alfa Aesar より販売)、トリエチルアミン (0.00830mL, 0.0599mmol) のジクロロメタン (3mL) 溶液を室温にて一晩攪拌した。減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ- [クロロホルム : メタノール = 100 : 0 (v/v) → クロロホルム : メタノール = 90 : 10 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.0490g, 64%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1536 (M+H) +

[0432] 実施例 15 : 薬物リンカー 13

[化 139]



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

出発物質 15-1 (5.41g, 10.9mmol, Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47, 1161) のジクロロメタン (50mL) 溶液に、0℃にて塩化オキサリル

(5. 63mL, 65. 7mmol) を加え、N, N-ジメチルホルムアミド (0.0844mL, 1.09mmol) 滴下した。反応溶液を室温まで昇温し、2時間攪拌した。減圧留去して得られた残渣をジクロロメタン (100mL) に溶解し、メチル (6S) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプタン-6-カルボキシレート塩酸塩 (4.28g, 24.1mmol, Tetrahedron Letters 2012. 53. 3847) とトリエリルアミン (6.07mL, 43.8mmol) のジクロロメタン溶液 (100mL) に窒素雰囲気下、-40°Cで滴下した。反応溶液を0°Cに昇温して2時間攪拌した。反応混合物に1規定塩酸 (100mL) を加え、有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、目的物 (8.40g、定量的) を得た。

¹H-NMR(DMSO-D₆) δ: 7.71(2H, s), 6.88(2H, s), 4.63(2H, m), 4.15-4.12(4H, m), 3.94(6H, s), 3.71(6H, s), 3.25(2H, m), 3.10(2H, m), 2.31-2.28(2H, m), 1.90-1.83(6H, m), 1.60-1.58(2H, m), 0.71-0.49(8H, m). MS(APCI, ESI)m/z: 769(M+H)⁺.

工程2: {1, 5-ペンタンジイルビス [オキシ (5-メトキシ-2-ニトロベンゼン-4, 1-ジイル)] } ビス { [(6S) -6- (ヒドロキシメチル) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] メタノン }

上記工程1にて得られた化合物 (8.40g, 10.9mmol) のTHF (100mL) 溶液に、水素化ほう素リチウム (714mg, 32.8mmol) を加え、0°Cにて30分攪拌し、室温に昇温して1時間攪拌した。0°Cにて1規定塩酸を加えた後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧下にて溶媒留去して、目的物 (7.70g, 99%) を得た。

¹H-NMR(DMSO-D₆) δ: 7.67(2H, s), 7.05(2H, s), 4.86-4.74(2H, m), 4.22-4.12(6H, m), 3.92(6H, s), 3.83-3.73(2H, m), 3.62-3.51(2H, m), 3.29(1H, m), 3.11(2H, m), 2.96(1H, m), 2.12-2.03(2H, m), 1.82-1.77(6H, m), 1.59-1.56(2H, m), 0.67-0.41(8H, m).

、

工程、 ジイルビス [オキシ キ ン
ゼン-4, 1-ジイル) カルボニル (6S) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプタン-

ジイル タンジイル アゼテ

上記工程2にて得られた化合物 (7. 70g、10. 8mmol) をピリジン (20mL)

無水 変 (10mL, 105. mm に溶解して、 温 覚 した。

去して 的 97%) を得た

¹ H-NMR(D ₂ O)	68(2 s)	2	47-4 46(2 m), 4.36-4 2 (4 m

7)

s 1. 4 m 0.64 0.45(8H m).

、) 7 (W+H)⁺。

[0435] 工程4: 1, 5-ペンタンジイルピス [オキシ (2-アミノ-5-メトキシベンゼン-4, 1-ジイル) カルボニル (6S) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプタン-5, 6-ジイルメタンジイル] ジアセテート

上記 程 化 の ジ チル ルム

アミド (100mL) 溶液に、5%パラジウム炭素 (54%水分、1.00g) を加えた後、反応溶液を水素雰囲気下、室温にて6時間激しく攪拌した。セライトろ過した後、ろ液を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ

イ ルム タ 精製し

得た (5.05g,

¹ H-NMR(D ₂ O)	D ₆ : 6.66(2 s	6.36(2 s	5.11(4 s	49(2 s	4.19(4

0(4	1	1 2	2	2	2	2
01(6 s), 1. 8	m	55(2 m	0. 0. (4 m	0.49-0.48(4 m).		

MS(APCI, ESI)^{m/z}: 737(M+H)⁺.

[0436] 工程5: { (6S) -5- [4- ({ (6S) -6- [(アセチルオキシ

シ) メチル] -5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル} カルボニル) -5-アミノ-2-メトキシフェノキシ] ペンチル} オキシ) -5-メトキシ-2- { (プロゾ-2-エノ-1-イルオキシ) カルボニル] アミノ} ベンゾイル]

-5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-6-イル} メチル アセテート (モノア

リルオキシカルボニル体)

上記工程4にて得られた化合物 (5. 05g, 6. 85mmol) のジクロロメタン (10mL) をピリジン 10mL, 7mmol) を加え、 素 気 下、 -7

0.47% [6 : N -] (2-1-1) カルボキシル - バイリル - N
 - { 4 - [({ [2- (6S) -6- [(アセチルオキシ) メチル] -6-ア
 ザス [4] へフト -6-イル} カルボニル) -6- (-6- [17- ({ (6
 S) -6- [(アセチルオキシ) メチル] -5-アザス [4] 、スト -s
 -1-イルオキ -1- { 2- -2- メトキシ -5- - { (2- -2- フロ -1- -1-イルオキ
 >) カルボニル] アニル] アセチル] オキシ) -4-メトキシ 2

エニル] カルバモイル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド
 上記工程5で得られたモノアリルオキシカルボニル体 (2.00g,
 実施例1工程6と同様に反応させ、 的 を得た

MS(APCI, ESI) m/z :1224(M+H)⁺.

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

上記工程6にて得られた化合物 (2.64g, 2.16mmol) のメタノール (10mL) 溶
 液に、炭酸カリウム (1.49g, 10.8mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。反応
 混合物に飽和塩化アンモニウム水溶液 (100mL) を加え、酢酸エチルで抽出し

水硫 ナトリウムで乾燥させた。減圧留去して、 的
 1g, 90%) を得た。

33(6H,

$$^{+}(H+I^{3/4}) \quad 017 \quad \downarrow \downarrow : Z / W \quad (IS3 \quad , I3dV \quad) \quad SI^{3/4}$$

[0713] 8% N _ [(2-フロレン-1-イルオキシ) カルボニル] -L -バニル-N
 - {4- [({ [(11a' S) -11' -ε フロキシ-8, - { [6- ({ (11a' S
) -11' -ε フロキシ-n, -ス トキシ-S, -オキソ-10' - [(2-フロレ
 ソ-1-イルオキシ) カルボニル] -6', 10', 11', 11a' -オトウ ε フ
 -1' H-ア ε フ [シク ロ ε ノ《 ヴ-1, 2' -ε フロ [2, 1-c] [1, 17] ヴソ
 ザジアゼレソ] 8_ -イル { # キシ) ヴンチル] オキシ } -フ -ズ トキシ
 -S, -オキソ-11', 11a' -ジ ε フロ-1, H-ア ε フ [シク ロ ε ノ《 ヴ-1
 , 2' -ε フロ [2, 1-c] [1, 17] ヴソ

上層にエーゼンを得られた化合物 (2.03g, 1.78mmol) のジクロロメタン (50mL) に、ブスラ-チンペルヨ-ジナシ (1.59g, 3.54mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。1%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、32%、34%、36%、38%、40%、42%、44%、46%、48%、50%、52%、54%、56%、58%、60%、62%、64%、66%、68%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%、98%、100% の濃度の炭酸水素ナトリウム水溶液 (100mL) を加え、ジクロロメタンで抽出した。減圧蒸留により、粗品を得た。粗品をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロマトソルベント: マジック) で精製し、得た。

[illegible]
$$+ (H + 1/3) \frac{g}{4} \frac{1}{\mu} (1S3, 13dV) S^{1/4}$$
[illegible]

[-5' -オキソ-11' , 11a' -ジクロロ-1' H-スルホ [シクロプロパン
-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼリン] -10' (5' H) -
イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -ルーア-ニ-アミド

上記工程8にて得られた化合物 (2. 05g, 1. 80mmol) を、実施例3工程12と
同様に反応させ、目的物 (1. 02g, 60%) を得た。

¹H-NMR(DMSO-D₆) δ: 10.08(1H, s), 7.57(2H, m), 7.32-7.20(3H, m), 7.05(2H, s), 6.
68-6.60(3H, m), 5.74(1H, m), 4.99-4.58(4H, m), 3.99-3.94(4H, m), 3.78-3.73(6H
, m), 3.66-3.38(4H, m), 3.15-3.01(3H, m), 2.40-2.34(3H, m), 1.89-1.81(6H, m), 1.
57-1.53(4H, m), 1.28(3H, m), 0.88(3H, m), 0.78(3H, m), 0.64-0.55(8H, m).

MS(APCI, ESI)m/z: 950(M+H)⁺.

[0441] 工程10: N- [4- (11, 12-ジチロロジベンゾ [b, f] アゾリン-5 (6H)

-イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリン-N- {4-
[({ [(11a' S) -11' -ピロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- {
(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 11a' -ジクロロ-1' H-
スルホ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼ
リン] -8' -イル} オキシ) ベンチル} オキシ] -5' -オキソ-11' , 11a
, 11a' -ジクロロ-1' H-スルホ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c]
[1, 4] ベンゾジアゼリン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ)
メチル] フェニル} -ルーア-ニ-アミド

上記工程9にて得られた化合物 (0. 710g, 0. 747mmol) と実施例2工程1に
て得られた化合物 (0. 313g, 0. 747mmol) をジクロロメタン (1. 5mL) とメ
タノール (0. 1mL) の混合溶媒に溶解した。4- (4, 6-ジメトキシ-1, 3,
5- リアジ 2 イル チルモルホリニ ムクロリ 264g,
. 897mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。減圧留去して得られた残渣を、
シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム: メタノール=100: 0
を得て

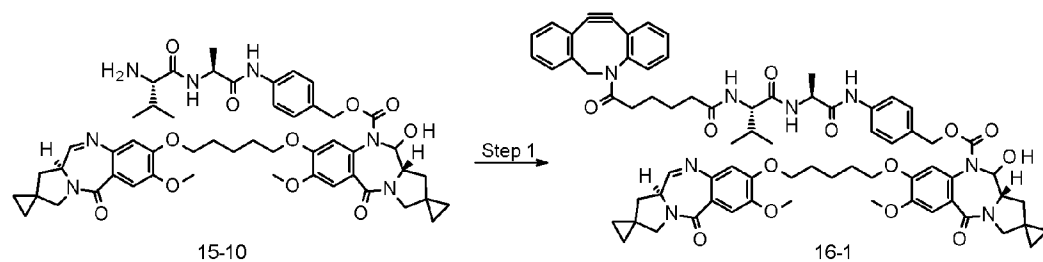
Table 2: 化合物13の¹H-NMRのピーク位置及びMS

¹H-NMR(DN D₆ (1H) . 2 81-7. 14

3 (1)

55(6H)

実施 シンカ



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

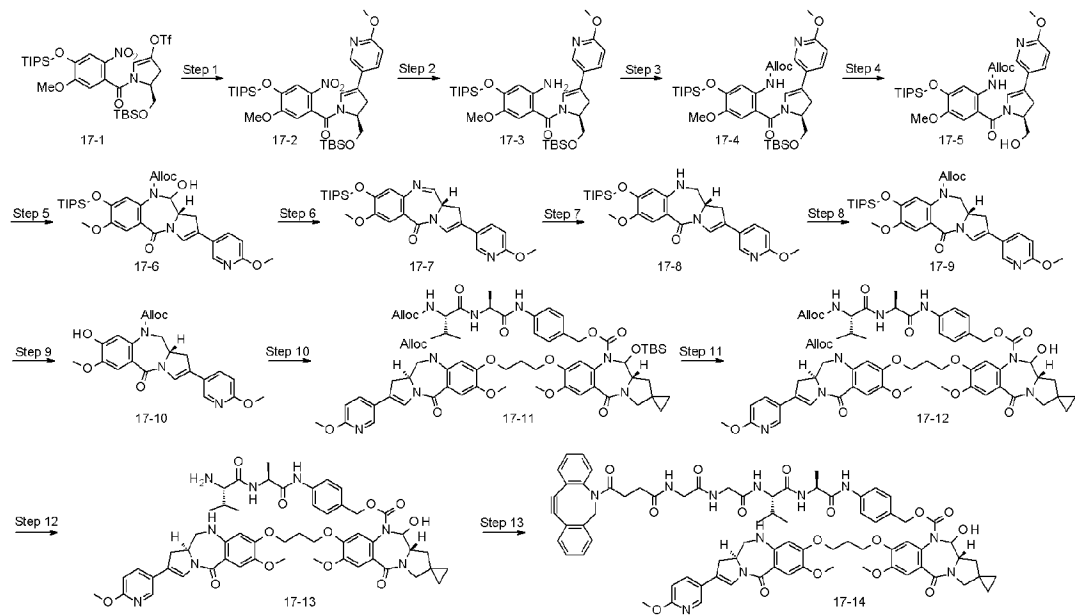
実施例15工程9にて得られた化合物 (0. 100g, 0. 105mmol) とアザジベンゾシクロオクチン酸 (0. 0351g, 0. 105mmol) を実施例15工程10と同様に反応させ、目的物 (0. 0702g, 53%) を得た。

- 1. 18(6H, m), 1. 09-1. 04(1 H, m), 0. 87-0. 77 (6H, m), 0. 69-0. 50 (8H, m) .

MS(APCI、ESI)m/z : 1265(M+H)⁺.

[0443] 実施例 17 : 薬物 リンカー 15

[化 141]



工程 1 : 化合物 17-2

出発原料 17-1 (2. 00g, 2. 81mmol, WO201 3053872) と 2-メトキシ-5-(4, 4, 5, 5-テトラメチル-1, 3, 2-ジオキサボロラン-2-イル)ピリジン (2. 00g, 8. 51mmol) を実施例 3 工程 6 と同様に反応させ目的物 (1. 89g、定量的) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 672(M+H)⁺.

[0444] 工程 2 : 化合物 17-3

上記工程 1 にて得られた化合物 (1. 89g, 2. 81mmol) をエタノール (30mL) とギ酸 (1. 5mL) の混合溶媒に溶解した。亜鉛粉末 (3. 68g) を加え、室温で 1 時間攪拌した。セライトろ過し、ろ液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100mL) を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧留去して、目的物 (1. 81g、定量的) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 642(M+H)⁺.

[0445] 工程 3 : 化合物 17-4

上記工程2にて得られた化合物 (1. 81g, 2. 82mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (1. 76g, 86%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :726(M+H)⁺.

[0446] 工程4 :化合物 17-5

上記工程3にて得られた化合物 (1. 76g, 2. 42mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (1. 05g, 71%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :612(M+H)⁺.

[0447] 工程5 :化合物 17-6

上記工程4にて得られた化合物 (1. 05g, 1. 71mmol) を、実施例9工程3と同様に反応させ、目的物 (0. 686g, 66%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :610(M+H)⁺.

[0448] 工程6 :化合物 17-7

上記工程5にて得られた化合物 (0. 481g, 0. 789mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0. 288g, 72%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :508(M+H)⁺.

[0449] 工程7 :化合物 17-8

上記工程6にて得られた化合物 (0. 288g, 0. 567mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させ、目的物 (0. 268g, 93%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :510(M+H)⁺.

[0450] 工程8 :化合物 17-9

上記工程7にて得られた化合物 (0. 267g, 0. 525mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 278g, 89%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :594(M+H)⁺.

[0451] 工程9 :化合物 17-10

上記工程8にて得られた化合物 (0. 278g, 0. 468mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0. 207g, 定量的) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :438(M+H)⁺.

[0452] 工程10 :化合物 17-11

-イル) -4-オキソチタル「チリシルチリル」-パリル-N- {4-
 [({ [(11a' S) -11' -レトロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [7
 -メトキシ-2- (6-メトキシ-3-レリジニル) -5-オキソ-5, 10, 11,
 11a-チトレトロ-1H-レトロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-
 イル) オキシ} フロホキシ) -5' -オキソ-11' , 11a' -ジレトロ-1' H
 -2レトロ [シクロプロパン-1, 2' -レトロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジア
 ゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル}

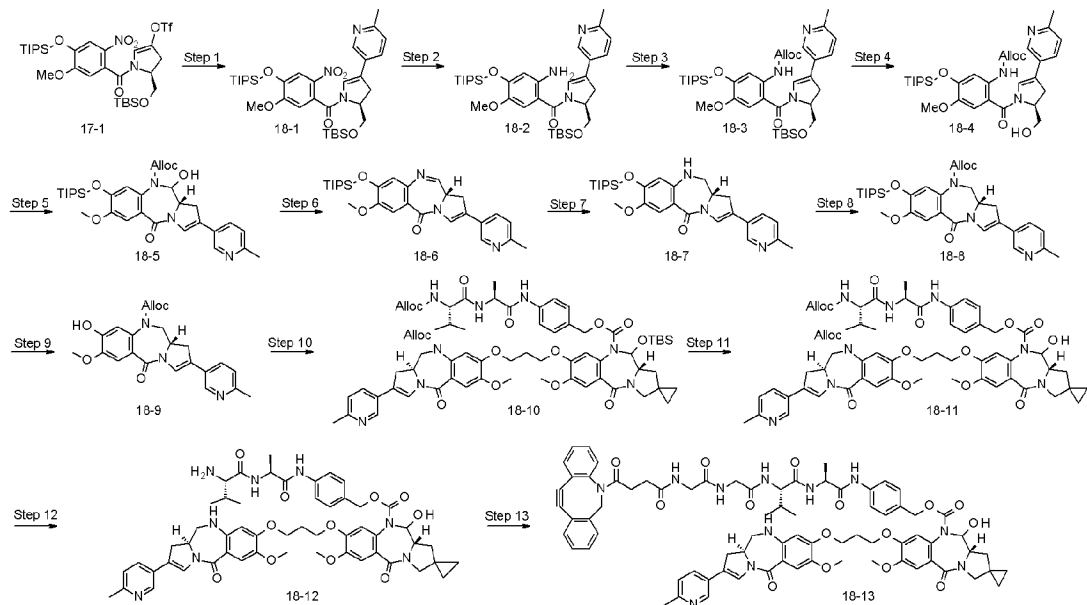
¹ H-NMR	(¹³ C)									
2	57	47(1H)	18(1 s), 5.89(1H, s), 5.37-4.96(3H,), 4.	m), 4.41-4.	2	2	2	2	2	2
9-	45(	) ,	64(3H,) ,	, 3	2	01	5	64(6		

m) .

MS(APCI、ESI)m/z : 1404(M+H)⁺.

[0456] 実施例 18 : 薬物 リンカー 16

[化 142]



工程 1 : 化合物 18-1

出発原料 17-1 (2.00g, 2.81mmol) と 2-メチル-5-ピリジニルボロン酸 (1.00g, 7.30mmol) を用いて実施例 3 工程 6 と同様に鈴木宮浦カップリング反応させ、目的物 (0.901g, 49%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 656(M+H)⁺.

[0457] 工程 2 : 化合物 18-2

上記工程 1 にて得られた化合物 (1.98g, 3.02mmol) を、実施例 17 工程 2 と同様に反応させ、目的物 (1.86g, 98%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 626(M+H)⁺.

[0458] 工程 3 : 化合物 18-3

上記工程 2 にて得られた化合物 (1.86g, 2.97mmol) を、実施例 3 工程 9 と同様に反応させ、目的物 (1.36g, 65%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 710(M+H)⁺.

工程4 化合物14

細

上記工程3にて得られた化合物 (1. 36g, 2. 42mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (0. 991g, 87%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:596(M+H)⁺.

[0460] 工程5 : 化合物18-5

上記工程4にて得られた化合物 (0. 991g, 1. 66mmol) を実施例9工程3と同様に反応させ、目的物 (0. 608g, 62%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:594(M+H)⁺.

[0461] 工程6 : 化合物18-6

上記工程5にて得られた化合物 (0. 405g, 0. 682mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0. 239g, 71%) を得た。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 8. 60 (1H, s), 8. 02 (1H, m), 7. 87 (1H, m), 7. 67 (1H, s), 7. 62 (1H, m), 7. 57-7. 54 (1H, m), 7. 40 (1H, s), 7. 25 (1H, m), 6. 74 (1H, s), 4. 53-4. 49 (1H, m), 3. 85 (3H, s), 3. 52 (2H, m), 2. 46 (3H, s), 1. 30-1. 24 (3H, m), 1. 07-1. 06 (18H, m) 目的物の水付加体として観測した。

MS(APCI、ESI)m/z:492(M+H)⁺.

[0462] 工程7 : 化合物18-7

上記工程6にて得られた化合物 (0. 239g, 0. 485mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させ、目的物 (0. 180g, 75%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:494(M+H)⁺.

[0463] 工程8 : 化合物18-8

[0465] 工程10：化合物18-10

上記工程9にて得られた化合物 (0.0780g, 0.185mmol) を、実施例1工程10にて得られた化合物の代わりに実施例1工程11にて得られた化合物 (0.258g, 0.278mmol) を用いて、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.213g, 91%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:1269(M+H)⁺.

[0466] 工程11：化合物18-11

上記工程10にて得られた化合物 (0.213g, 0.168mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.182g, 94%) を得た。

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 10.00-9.85(1H, m), 8.54(1H, s), 8.32(1H, m), 8.16(1H, s), 7.82(1H, m), 7.65-7.56(3H, m), 7.35-7.06(6H, m), 6.79(1H, m), 6.57(1H, s), 5.87-5.80(3H, m), 5.26-5.09(5H, m), 4.85-4.83(1H, m), 4.56-4.40(5H, m), 4.13(5H, m), 3.92-3.87(2H, m), 3.80(5H, s), 3.58-3.54(1H, m), 3.21-3.09(3H, m), 2.81(1H, m), 2.45(3H, s), 2.36-2.34(1H, m), 2.16-2.10(2H, m), 1.98-1.92(1H, m), 1.57(2H, m), 1.30-1.28(4H, m), 0.92-0.84(7H, m), 0.67-0.62(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z:1155(M+H)⁺.

[0467] 工程12：化合物18-12

上記工程11にて得られた化合物 (0.182g, 0.157mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.0751g, 48%) を得た。

¹H-NMR(DN) δ: 7.7(1H, s), 7.7(1H, s), 7.5(2H, s), 7.21-7.2(2H, s), 7.1(1H, s), 7.0(1H, s), 6.9(1H, s), 6.8(1H, s), 6.7(1H, s), 6.6(1H, s), 6.5(1H, s), 6.4(1H, s), 6.3(1H, s), 6.2(1H, s), 6.1(1H, s), 6.0(1H, s), 5.9(1H, s), 5.8(1H, s), 5.7(1H, s), 5.6(1H, s), 5.5(1H, s), 5.4(1H, s), 5.3(1H, s), 5.2(1H, s), 5.1(1H, s), 5.0(1H, s), 4.9(1H, s), 4.8(1H, s), 4.7(1H, s), 4.6(1H, s), 4.5(1H, s), 4.4(1H, s), 4.3(1H, s), 4.2(1H, s), 4.1(1H, s), 4.0(1H, s), 3.9(1H, s), 3.8(1H, s), 3.7(1H, s), 3.6(1H, s), 3.5(1H, s), 3.4(1H, s), 3.3(1H, s), 3.2(1H, s), 3.1(1H, s), 3.0(1H, s), 2.9(1H, s), 2.8(1H, s), 2.7(1H, s), 2.6(1H, s), 2.5(1H, s), 2.4(1H, s), 2.3(1H, s), 2.2(1H, s), 2.1(1H, s), 2.0(1H, s), 1.9(1H, s), 1.8(1H, s), 1.7(1H, s), 1.6(1H, s), 1.5(1H, s), 1.4(1H, s), 1.3(1H, s), 1.2(1H, s), 1.1(1H, s), 1.0(1H, s), 0.9(1H, s), 0.8(1H, s), 0.7(1H, s), 0.6(1H, s), 0.5(1H, s), 0.4(1H, s), 0.3(1H, s), 0.2(1H, s), 0.1(1H, s), 0.0(1H, s).

MS(APCI、ESI)m/z:987(M+H)⁺.

[0468] 工程13：N-[4-(11, 12-ジクロロベンゾイル)ピペリジン-5-イル]アミン (6H)

ーイル) ー4ーオキソブタノイル] グリシルグリシルーLーバシルーNー {4ー
 (11a' 1' ーレ コキシ キシ , 7
 ーメトキシー2ー (6ーメチルー3ーピリジニル) ー5ーオキノー5, 10, 11, 11
 aーチトラヒドロー11ーピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピンー8ーイ
 ル] オキシ} フロボキシ) ー5' ーオキノー11' , 11a' ージヒドロー1' Hー
 スピロ [シクロプロパンー1, 2' ーピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼ
 レン , , イル カル ニル オキシ チル フェル
 ーアラニニアミド
 上 程 2 化合 761 を、実 工

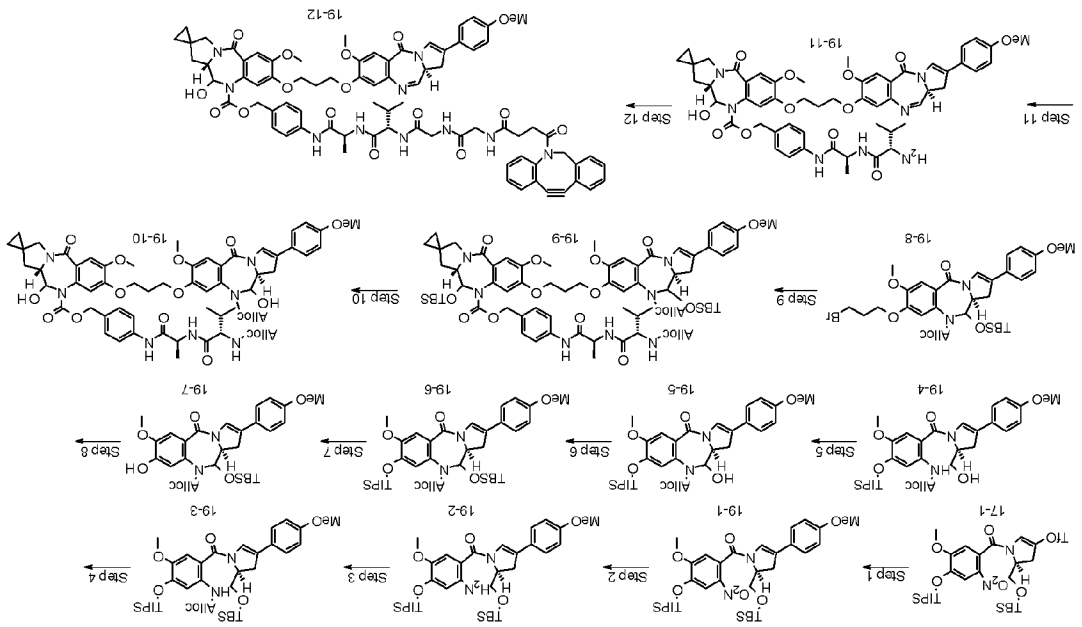
程 と 同 () 的 01 11 得

1H-NMR		4. m), 4. m), 4. m)		2 2 2		4(4 2-1 4(3H	
1	7	24	(1	2	4	4	01
5	7. (4	5	1	2	4	4	34(2

MS(APCI、ESI)m/z:1388(M+H)⁺.

[0469] 実施例19：薬物リシカー17

[化143]



工程1: [(2S) -2- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) シフ ニル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ピロールイル] オキシ} フェニル) メタノン

出発物質17-1 (2. 00g, 2. 81mmol) を、実施例3工程6と同様に反応させ、目的物 (1. 31g, 93%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.75-7.73(1H, m), 7.12(2H, m), 6.82-6.76(4H, m), 6.13-6.11(1H, m), 4.80-4.70(1H, m), 3.93-3.91(3H, m), 3.79-3.75(4H, m), 3.21-3.15(1H, m), 3.01-2.93(1H, m), 1.34-1.25(3H, m), 1.12(18H, m), 0.89(9H, s), 0.13--0.18(6H, m).

MS(APCI, ESI)m/z: 671(M+H)⁺

工程2: (2-アミノ-5-メトキシ-4- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) [(2S) -2- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -4- (4-メトキシフェニル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル] メタノン

上記工程1にて得られた化合物 (1. 31g, 1. 95mmol) 実施例17工程2と同様に反応させ、目的物 (1. 12g, 90%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.21-7.18(2H, m), 6.85-6.81(2H, m), 6.79-6.76(2H, m), 6.28(1H, s), 4.42(2H, m), 3.98-3.93(1H, m), 3.90-3.86(1H, m), 3.80(3H, s), 3.71(3H, s), 3.11(1H, m), 2.98(1H, m), 1.32-1.23(4H, m), 1.12-1.10(18H, m), 0.85(9H, s), 0.08-0.02(6H, m).

[] 工程3: プロブ-2-エン-1-イル (2- { [(2S) -2- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -4- (4-メトキシフェニル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル] カルボニル} -4-メトキシ-5- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバメート

上記工程2にて得られた化合物 (1. 12g, 1. 59mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 890g, 77%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ

工程4：プロパン-2-エン-1-イル (11aS) -11- { [(2S) -2- (ヒドロキシメチ
キシフェニル) -2, 3-ジヒドロ-1H-ピロール
カルボニ
キシ
ピ
ル
ル
] オキシ} フェニル) カルバメート

上記工程3にて得られた化合物 (0. 890g, 1. 23mmol) 実施例1工程7 様に反応させ、目的物 (0. 696g, 93%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 8. 54-8. 36(1H, m), 7. 71(1H, m), 7. 18-7. 17(2H, m), 6. 86-6. 84(3H, m), 6. 77(1H, m), 5. 94-5. 90(1H, m), 5. 32(1H, m), 5. 21(1H, m), 4. 87-4. 85(1H, m), 4. 61(2H, m), 4. 50(1H, m), 3. 96-3. 84(2H, m), 3. 80(3H, s), 3. 76(3H, s), 3. 28(1H, m), 2. 64(1H, m), 1. 36-1. 25(3H, m), 1. 13(18H, m).

MS(APCI、ESI)m/z: 611(M+H)⁺

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

上記工程4にて得られた化合物 (0. 696g, 1. 14mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (0. 532g, 77%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 7. 36(1H, s), 7. 31-7. 29(2H, m), 7. 22(1H, s), 6. 90-6. 87(2H, m), 6. 72(1H, m), 5. 82-5. 76(2H, m), 5. 19-5. 14(2H, m), 4. 60(1H, m), 4. 49-4. 46(1H, m), 3. 98-3. 96(1H, m), 3. 86(3H, s), 3. 82(3H, s), 3. 44(1H, m), 3. 36(1H, m), 3. 05(1H, m), 1. 28-1. 21(3H, m), 1. 10-1. 07(18H, m). MS(APCI、ESI)m/z: 609(M+H)⁺

工程6：プロパン-2-エン-1-イル (11aS) -11- { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-8- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -11, 11a-ジ

ヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-10 (5H) -カルボキシレート

上記工程5にて得られた化合物 (0. 532g, 0. 874mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (0. 532g, 95%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7. 35(1H, s), 7. 29(2H, m), 7. 23(1H, s), 6. 89(2H, m), 6. 70(1H, s), 5. 90(1H, m), 5. 76(1H, m), 5. 14-5. 10(2H, m), 4. 60(1H, m), 4. 38(1H, m), 3. 93-3. 85(1H, m), 3. 87(3H, s), 3. 82(3H, s), 3. 32(1H, m), 2. 82-2. 78(1H, m), 1. 29-1. 22(3H, m), 1. 12-1. 07(18H, m), 0. 89(9H, s), 0. 27(3H, s), 0. 20(3H, s). MS(APCI, ESI) m/z : 723(M+H)⁺

工程7: プロプ-2-エン-1-イル (11aS) -11- { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -8-ヒドロキシ-7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-11, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-10 (5H) -カルボキシレート

上記工程6にて得られた化合物 (0. 532g, 0. 756mmol) を、実施例1工程10様に反応させ、目的物 (0. 359g, 86%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7. 34(1H, s), 7. 30-7. 27(3H, m), 6. 90-6. 88(2H, m), 6. 76(1H, s), 5. 93-5. 90(2H, m), 5. 81-5. 73(1H, m), 5. 12-5. 08(2H, m), 4. 61(1H, m), 4. 42(1H, m), 3. 97(3H, s), 3. 93-3. 88(1H, m), 3. 83(3H, s), 3. 31(1H, m), 2. 83-2. 79(1H, m), 0. 91(9H, s), 0. 27(3H, s), 0. 22(3H, s).

MS(APCI, ESI) m/z : 567(M+H)⁺

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

上記工程7にて得られた化合物 (0. 405g, 0. 715mmol) を、実施例4工程1と同様に反応させ、目的物 (0. 490g, 99%) を得た。

), 4.20-4.13(2H, m), 3.94-3.88(1 H, m), 3.92(3H, s), 3.83(3H, s), 3.62(2H, m), 3.32(1 H, m), 2.83-2.80(1 H, m), 2.41-2.36(2H, m), 0.91(9H, s), 0.27(3H, s), 0.24(3 H, s).

MS(APCI、ESI)m/z :687(M+H) +

[0477] 工程9: N₁ [(プロップ₂ エン-1₁ イルオキシ) カルボニル] ₁ バリル-N- {4₁ [({ [(11a, S) ₈' ₁ [3₁ ({ (11aS) - 11- { [tert - プチル (ジメチル) シリル] オキシ } ₇-メトキシ-2₁ (4-メトキシフェニル) ₅ オキソ ₁₀ [(プロップ₂-エン₁ イルオキシ) カルボニル] -5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H₁ ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル } オキシ) プロボキシ] -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-1Γ₁, 11a' -ジヒドロ₁ Γ₁ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル } オキシ) メチル] フェニル } -L-アラニンアミド

上記工程8にて得られた化合物 (0.490g, 0.713mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.600g, 60%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :1414(M+H) +

[0478] 工程10: N₁ [(プロップ₂ エン-1₁ イルオキシ) カルボニル] -L-バリル-N₁ {4₁ [({ [(11a, S) - 11' -ヒドロキシ-8' - [3₁ ({ (11aS) - 11-ヒドロキシ ₇-メトキシ-2₁ (4-メトキシフェニル) ₅-オキソ ₁₀ [(プロップ₂ エン-1₁ イルオキシ) カルボニル] ₅, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H₁ ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン₈-イル } オキシ) プロボキシ] ₇' -メトキシ₅' -オキソ-1Γ₁, 11a' -ジヒドロ₁ Γ₁ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] ₁₀' (5' H) -イル] カルボニル } オキシ) メチル] フェニル } -L-アラニンアミド

上記工程9にて得られた化合物 (0.600g, 0.424mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.500g, 99%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :1184(M-H) +

[0479] 工程11: L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -エトロキシ-7'-メトキシ-8' - (3- { [(11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 11a-ジエトロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} フロボキシ) -5' -オキソ-11' , 11a'-ジエトロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] ' -ジエトロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -ローラニミド

上記工程9にて得られた化合物 (0. 500g, 0. 421mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0. 113g, 27%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8. 94(1H, s), 7. 70(1H, s), 7. 56-7. 53(2H, m), 7. 46-7. 44(2H, m), 7. 36(1H, s), 7. 31(2H, m), 7. 23(1H, s), 7. 03(2H, m), 6. 90-6. 88(2H, m), 6. 68(1H, m), 6. 57(1H, s), 6. 40(1H, s), 5. 92(1H, m), 5. 43(1H, m), 4. 67(1H, m), 4. 55-4. 53(1H, m), 4. 46(1H, m), 4. 35-4. 33(1H, m), 4. 28-4. 24(1H, m), 4. 15-4. 13(1H, m), 3. 88(3H, s), 3. 87(3H, s), 3. 83(3H, s), 3. 77-3. 72(1H, m), 3. 62-3. 60(1H, m), 3. 52-3. 47(2H, m), 3. 34(1H, m), 3. 30-3. 28(1H, m), 3. 00-2. 91(2H, m), 2. 50-2. 41(2H, m), 2. 24-2. 22(1H, m), 2. 10-2. 08(1H, m), 1. 77-1. 75(1H, m), 1. 40-1. 37(1H, m), 1. 16(3H, m), 0. 82(3H, m), 0. 76-0. 62(4H, m), 0. 69(3H, m).

MS(APCI, ESI)m/z: 1000(M+H)⁺

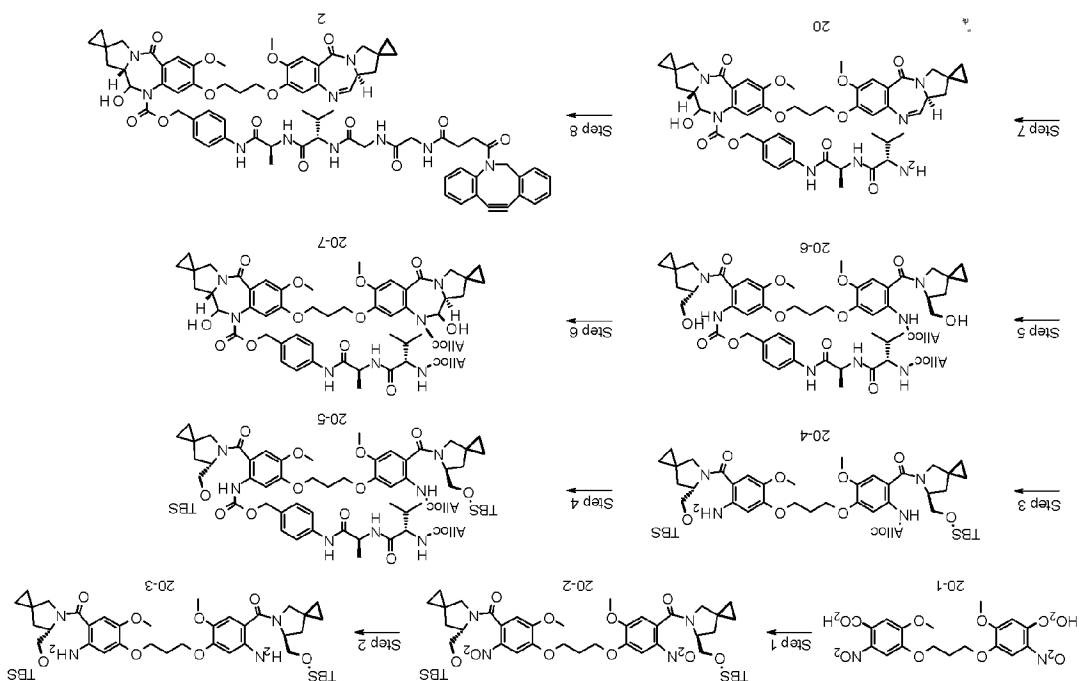
[0480] 工程12: N- [4- (11, 12-ジエトロ-1H-ピロロ [b, f] フゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソ-2-イル] フリシリシリル-L-バリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -エトロキシ-7'-メトキシ-8' - (3- { [(11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 11a-ジエトロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} フロボキシ) -5' -オキソ-11' , 11a'-ジエトロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -ローラニミド

上記工程11にて得られた化合物 (0. 157g, 0. 157mmol) を、実施例3工程1

[0481] 実施例20：薬物リシカー18
MS(APCI, ESI) m/z :1401(M+H)⁺

と同一に 120g, 49%)を得た。

[化144]



工程1：{プロパン-1, 3-ジイルビス [オキシ] (5-メトキシ-2-ニトロベ
ンゼン 4, ジイル
チル) シリル] オキシ} メチル) -5-アザスピロ [2, 4] ヘプト-5-イル

例 2
Chem of the

4939) 例程で 化合物 42g, 14 mm を実施例 5 程と同一に 得

¹ H-NMR (	79-7.70(2H,)	5 2	4. 4.	5	4. 5
-4 2	5 m), 4.	5	7-	5	
2	5 m), 2	5 m), -2	4	2 m	14
2 (1H	(1	(1	(1		
4(4	62(4	57-0.49(4H,	7	4	

. 11 (9H, m), -0.14 (3H, m).

MS(APCI、ESI)m/z: 912 (M+H)⁺

工程2: {プロパン-1, 3-ジイルビス [オキシ (2-アミノ-5-メトキシベンゼン-4, 1-ジイル)] } ビス { [(6S) -6- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] メタノン} }

上記工程1にて得られた化合物 (3. 74g, 4. 10mmol) を、実施例15工程4と同様に反応させ、目的物 (2. 97g, 85%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.79-7.69(2H, m), 6.82-6.75(2H, m), 4.54-4.47(1.5H, m), 4.36-4.26(4.5H, m), 4.03(0.5H, m), 3.98-3.92(6H, m), 3.88(0.5H, m), 3.61-3.51(1H, m), 3.39-3.32(0.5H, m), 3.28-3.21(0.5H, m), 3.05-2.93(3H, m), 2.45-2.39(2H, m), 2.24-2.21(1H, m), 2.08-2.06(1H, m), 2.00-1.99(1H, m), 1.69-1.66(1H, m), 1.57-1.54(5H, m), 0.94-0.88(14H, m), 0.78-0.74(4H, m), 0.71-0.62(4H, m), 0.57-0.49(4H, m), 0.44-0.40(2H, m), 0.13-0.10(9H, m), -0.11--0.17(3H, m). MS(APCI、ESI)m/z: 853 (M+H)⁺

工程3: プロプ-2-エン-1-イル (5- [3- (5-アミノ-4- { [(6S) -6- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] カルボニル} -2-メトキシフェニル) プロポキシ] -2- { [(6S) -6- ({ [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] カルボニル} -4-メトキシフェニル) カルバメート

上記工程2にて得られた化合物 (2. 97g, 3. 48mmol) を実施例15工程5と同様に反応させ、目的物 (0. 549g, 17%) を得た。

δ

δ

δ

δ

(12H,

MS(APCI、ESI)m/z : 1021 (M+H)⁺

[0484] 工程4: N- [(プロポ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニル] _L_ バリル
 -N- [4- ({ [(2- { [(6S) -6- ({ [tert -ブチル (ジメチル) シ
 リル] オキシ} メチル) _5_ アザスピロ [2. 4] ヘプト_5_ イル] カルボ
 ニル} -5- [3- (4- { [(6S) -6- ({ [tert -ブチル (ジメチル) シ
 リル] オキシ} メチル) _5_ アザスピロ [2. 4] ヘプト_5_ イル] カルボ
 ニル} _2-メトキシ-5_ { [(プロポ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボ
 ニル] アミノ} フェノキシ) プロポキシ] _4-メトキシフェニル) カルバモ
 イル] オキシ} メチル) フェニル] _L-アラニンアミド

上記工程3にて得られた化合物 (0. 549g, 0. 586mmol) を、実施例1工程6
 と同様に反応させ、目的物 (0. 402g, 51%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1341 (M+ H) +

[0485] 工程5: N- [(プロポ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニル] _L_ バリル
 -N- [4- ({ [(2- { [(6S) -6- (ヒドロキシメチル) _5-アザスピ
 ロ [2. 4] ヘプト_5_ イル] カルボニル} -5- [3- (4- { [(6S) _6-
 (ヒドロキシメチル) _5_ アザスピロ [2. 4] ヘプト-5_ イル] カルボ
 ニル} _2-メトキシ-5_ { [(プロポ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボ
 ニル] アミノ} フェノキシ) プロポキシ] _4-メトキシフェニル) カルバモ
 イル] オキシ} メチル) フェニル] _L-アラニンアミド

上記工程4にて得られた化合物 (0. 402g, 0. 300mmol) を、実施例1工程7
 と同様に反応させ、目的物 (0. 282g, 85%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1120 (M+ H) +

[0486] 工程6: N- [(プロポ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニル] _L_ バリル
 -N- {4_ [({ [(11a, S) - 11' -ヒドロキシ-8' - [3- ({ (11a, S)
 - 11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-10' - [(プロポ-
 2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニル] -5' , 10' , 1Γ , 11a' -テトラ
 ヒドロ_ Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4
] ベンゾジアセピン] _8' -イル} オキシ) プロポキシ] _7' -メトキシ

_5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—アラニンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (0. 282g, 0. 253mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (0. 0600g, 21%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1106 (M-H) +

[0487] 工程7: L—バリル—N— {4— [({ [(11a, S) —1Γ —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' — (3— { [(11a' S) —7' —メトキシ—5' —オキソ—5' , 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —8' —イル] オキシ} プロボキシ) —5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—アラニンアミド

上記工程6にて得られた化合物 (0. 0600g, 0. 0541 mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0. 0347g, 70%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 922 (M+ H) +

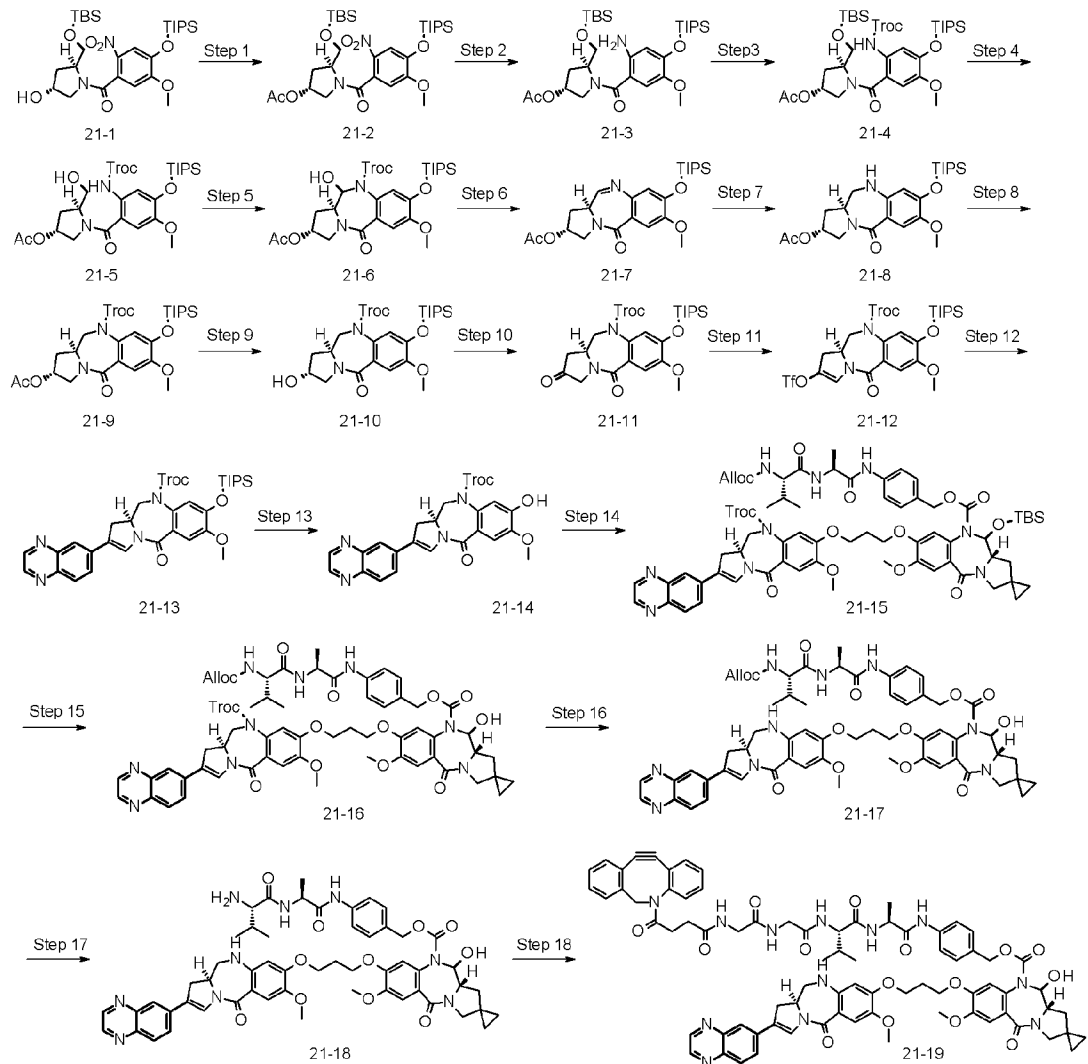
[0488] 工程8: N— {4— (11, 12—ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン—5 (6H) —イル) —4—オキソブタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N— {4— [({ [(11a, S) —11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' — (3— { [(11a' S) —7' —メトキシ—5' —オキソ—5' , 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —8' —イル] オキシ} プロボキシ) —5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—アラニンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0. 0347g, 0. 0376mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0. 00770g, 16%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1323 (M+ H) +

[0489] 実施例 21 : 薬物 リンカー 19

[化 145]



工程 1 : 化合物 21-2

出発原料 21-1 (11.8 g, 20.2 mmol, WO 2013053872) および ピリジン (1.79 mL, 22.2 mmol) の THF (50 mL) 溶液に、氷冷下にて、無水酢酸 (210 mL, 22.3 mmol) をゆっくりと加えた。次いで 4-ジメチルアミノピリジン (0.459 g, 3.76 mmol) を加えて、室温で撹拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 90

: 10 (v/v) ～60 : 40 (v/v)] にて精製し、目的物 (12.3g, 97%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 625(M+H) +

[0490] 工程2 : 化合物21-3

上記工程1にて得られた化合物 (12.3g, 19.7mmol) を、実施例15工程4と同様に反応させ、目的化合物 (11.3g, 97%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 595(M+H) +

[0491] 工程3 : 化合物21-4

上記工程2にて得られた化合物 (11.3g, 19.0mmol) を、クロロギ酸アリの代わりにクロロギ酸2、2、2-トリクロロエチル (2.93mL, 21.9mmol) を用いて、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (12.4g, 85%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 769(M+H) +

[0492] 工程4 : 化合物21-5

上記工程3にて得られた化合物 (12.4g, 16.1mmol) を実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (9.90g, 94%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 655(M+H) +

[0493] 工程5 : 化合物21-6

上記工程4にて得られた化合物 (9.90g, 15.1mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (8.19g, 83%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 653(M+H) +

[0494] 工程6 : 化合物21-7

上記工程5にて得られた化合物 (3.00g, 4.59mmol) のテトラヒドロフラン (10mL)、10%酢酸アンモニウム水溶液 (10mL) に、10% CdZPb (3.00g, 24.0mmol, 90mass%) を加え、窒素雰囲気下、激しく撹拌した。原料消失後、反応混合物をろ過した。ろ液をジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧留去して得られた化合物 (2.10g, 99%) をそのまま次の反応に用いた。

[0495] 工程7：化合物21-8

上記工程6にて得られた化合物 (2. 10g, 4. 56mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させ、目的物 (2. 09 99%) を得た。

MS(APCI, ESI) m/z : 463(M+H)⁺

[0496] 工程8：化合物21-9

工程7にて得られた化合物 (2. 09g, 4. 52mmol) を、実施例21工程3と同様に

(c) 2 的 100% を得た

¹H-NMR (δ) 2. 1 7 (1) 41 (

¹H) 21 () (1) 2 (1) s . 7 . 7

2 : -2 2 (1) 2

04 (18)

MS(APCI, ESI) m/z : 637(M+H)⁺

[0497] 工程9：化合物21-10

工程8にて得られた化合物 (2. 28g, 4. 51mmol) のメタノール (15mL)、

ヒド ン 溶液に炭力 52

) の水 (15mL) 溶液をゆっくりと滴下した、室温で撹拌した。原料消失後、

反応混合物に水を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和

食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧留去して得

られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル

10

的

(%)

を得た

¹H-NMR (δ) 64

m), 4. (1) (2) 2 (2) 2 2 m

2 7 (1H) 2 2 (N

、

工程1 化合物 -11

[

工程9にて得られた化合物 (2. 08g, 3. 49mmol) および2、2、

ヲ

ラメチル-1-ペリジロオキシラジカル (0.109g, 0.698mmol) のジクロロメタン (50mL) 溶液に、氷冷下にて、ヨードベンゼンジアセテート (2.00g, 6.21mmol) をゆっくりと加えた。反応混合物を室温下で2時間攪拌した。原料消失後、反応混合物に水を加え、反応混合物をジクロロメタンで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。ろ過後、減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン：酢酸エチル=90：10 (v/v) ~60：40 (v/v)] にて精製し、目的物 (1.94g, 94%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.21(1H,s), 6.84(1H,s), 4.96(1H,m), 4.44(1H,m), 4.34-4.23(3H,m), 3.99-3.92(1H,m), 3.86(3H,s), 3.68-3.62(1H,m), 2.94(1H,m), 2.50-2.46(1H,m), 1.29-1.21(3H,m), 1.21-1.21(18H,m).

MS(APCI, ESI)m/z: 593(M+H)⁺

[0499] 工程11：化合物21-12

上記工程10にて得られた化合物 (1.94g, 3.27mmol) を、実施例3工程5と同様に反応させ、目的物 (2.17g, 92%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.22-7.18(2H,m), 6.84(1H,s), 4.95(1H,m), 4.45-4.39(2H,m), 4.23-4.15(1H,m), 3.85(3H,s), 3.64(1H,m), 3.36-3.30(1H,m), 2.74-2.68(1H,m), 1.29-1.19(3H,m), 1.11-1.04(18H,m).

[0500] 工程12：化合物21-13

上記工程11にて得られた化合物 (0.837g, 1.15mmol) とキノキサリン-6-ボロシ酸ピナコールエステル (1.18g, 4.61mmol) を、実施例3工程6と同 (c) 的 . 7 88%) を得た

¹H-NMR (s) : 8.82 (2H (1 (1 7.5 2 (1H,s), 6.88(1H,s), 4.96(1H,m), 4.49-4.40(2H,m), 4.37-4.28(1H,m), 3.88 5(1 m), 4 (1 22 -1

),
(N

[0501] 工程13：化合物21-14

上記工程12にて得られた化合物 (0.713g, 1.01mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0.400g, 72%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.81–8.80(2H, m), 8.05(1H, m), 7.95(1H, m), 7.80–7.75(2H, m), 7.29(1H, s), 6.96(1H, s), 6.10(1H, m), 5.07(1H, m), 4.45–4.32(3H, m), 3.98(3H, s), 3.80–3.73(1H, m), 3.51–3.46(1H, m), 2.91(1H, m). MS(APCI, ESI) m/z : 549 (M+H)⁺

] 工程14: 化合物21-15

上記工程13にて得られた化合物 (0.200g, 0.364mmol) を、実施例1工程1にて得られた化合物 (0.321g, 0.346mmol) を用いて、実施例3工程10と同様にカップリング反応させ、目的物 (0.475g, 99%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.83–8.79(2H, m), 8.65–8.55(1H, m), 8.09–7.98(2H, m), 7.92–7.82(2H, m), 7.47–7.31(2H, m), 7.24–7.19(1H, m), 7.14–7.02(2H, m), 6.97–6.88(1H, m), 6.80–6.66(1H, m), 6.55–6.47(1H, m), 6.06–6.00(1H, m), 5.97–5.85(1H, m), 5.51–5.09(3H, m), 4.82–4.71(2H, m), 4.63–4.52(2H, m), 4.48–4.30(2H, m), 4.26–4.17(2H, m), 4.16–4.09(1H, m), 4.08–3.98(3H, m), 3.9–3.73(6H, m), 3.53–3.44(2H, m), 3.28–3.26(1H, m), 2.94–2.91(1H, m), 2.40–2.33(2H, m), 2.21–2.13(1H, m), 2.07–2.03(4H, m), 1.67–1.50(2H, m), 1.46–1.39(2H, m), 1.29–1.24(2H, m), 1.00–0.60(18H, m), 0.22–0.06(6H, m). MS(APCI, ESI) m/z : 1395 (M+H)⁺

工程15: 化合物21-16

上記工程14にて得られた化合物 (0.475g, 0.340mmol) を、実施例3工程1と同様に反応させ、目的物 (0.310g, 71%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.83–8.79(2H, m), 8.72(1H, m), 8.07–8.01(2H, m), 7.88(2H, m), 7.41–7.39(2H, m), 7.23(1H, m), 7.13(2H, m), 6.84(1H, m), 6.56(1H, s), 5.95–5.88(2H, m), 5.48–5.47(1H, m), 5.32–5.10(3H, m), 4.87–4.72(2H, m), 4.61–4.55(2H, m), 4.47–4.20(3H, m), 4.07–4.03(2H, m), 3.90(3H, s), 3.83(3H, s), 3.80–3.72(3H,

[0504] 工程16：化合物21-17

上記 5 mm 化合物を、実工程 121

と同一に 的 9, を得

¹H-NMR (δ) 4-7 49-7.41

25-7. (1) 5.51-5.45

2 5 34 5 2 5 21 (1H m), 4. (4 m), 4. 7-4.

4-3 5 (1H), -2 4

2 2 1. 5 94 (3H

MS(APCI、ESI)m/z:1108(M+H)⁺

[0505] 工程17：化合物21-18

上記 工程 を、実工程1

2と同一に 的 112 2 を得

¹H-NMR (δ) 2 7. 2

(1H 7. (1H 44 (1H m),

(1H, m), 5.90 (1H, m), 5.34 (1H, m), 4.74-4.63 (3H, m), 4.42 (1H, m), 4.16-4.03 (3H,

, 3, 3.74-3.72 51 (4H, 2 2

(1H), -2 (1), 2 , 1.7 (4),

4 4 (3H, 62 (4

MS(APCI、ESI)m/z:1024(M+H)⁺

[0506] 工程18：N- [4- (11, 12-ジフェニルプロピル)アミノ]アミノ-N- {4-

-イリル) -4-オキソブタノイル] アリシルアリシル-ル-バリル-N- {4-

(11a') -イリル コキシ , キシ

7 キシ 5 オキシ 2 キ キサリ 1 5

11, 11a-チトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼリン

-8-イリル] オキシ} プロボキシ) -5' -オキノ-11', 11a' -ジヒドロ-

1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾ-

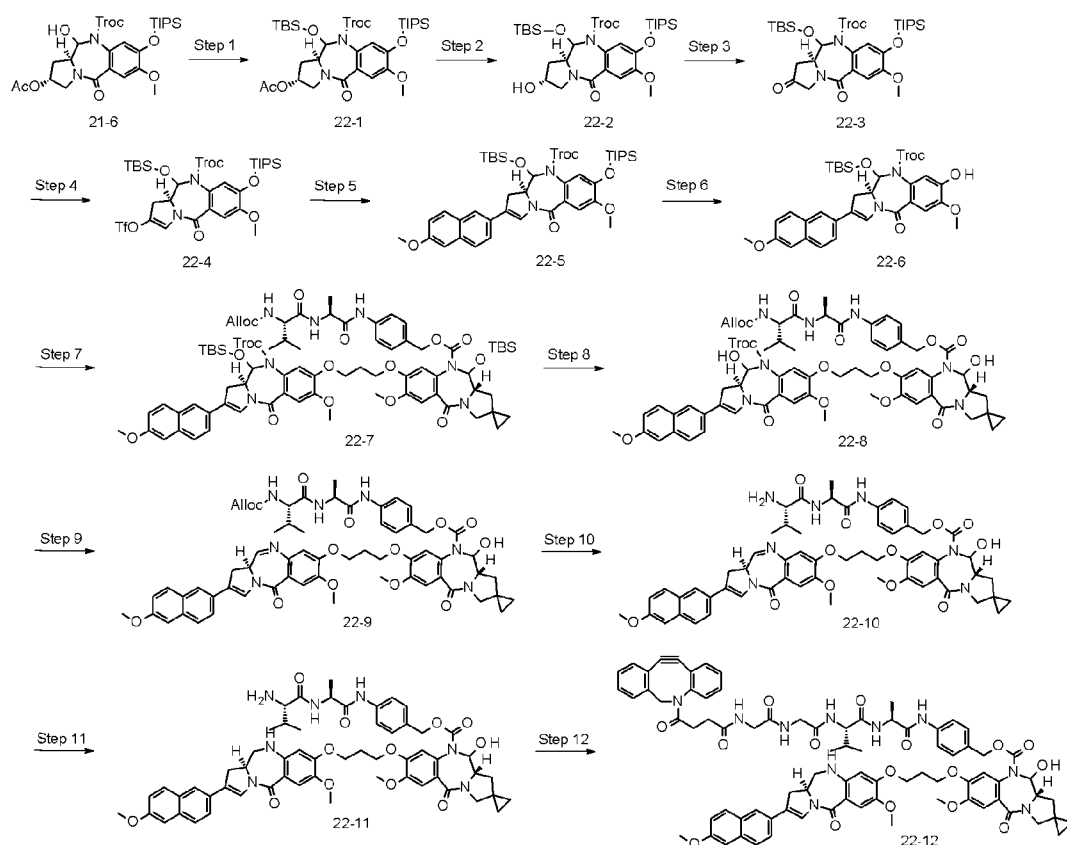
ジアセピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニ
ル} - L-アラニンアミド

上記工程 18 にて得られた化合物 (0. 112g, 0. 109mmol) を、実施例 3 工程 1
3 と同様に反応させ、目的物 (0. 110g, 71%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1425 (M+H) +

[0507] 実施例 22 : 薬物 リンカー-20

[化 146]



工程 1 : 化合物 22-1

実施例 21 工程 5 にて得られた化合物 (5. 11g, 7. 81mmol) を、実施例 1 工程
9 と同様に反応させ、目的物 (5. 70g, 95. 0%) を得た。

MS(APCI、ESI) m/z : 767(M+H) +

[0508] 工程 2 : 化合物 22-2

上記工程 1 にて得られた化合物 (5. 70g, 7. 42mmol) を、実施例 21 工程 9 と
同様に反応させ、目的物 (5. 07g, 94%) を得た。

MS(APCI, ESI)^{m/z}: 725(M+H)⁺

[0509] 工程3: 化合物22-3

上記工程2にて得られた化合物 (5. 07g, 6. 98mmol) を、実施例21工程10と同様に反応させ、目的物 (4. 44g, 88%) を得た。

MS(APCI, ESI)^{m/z}: 723(M+H)⁺

[0510] 工程4: 化合物22-4

上記工程3にて得られた化合物 (4. 44g, 6. 13mmol) を、実施例3工程5と同様に反応させ、と同様に反応させ、目的物 (4. 85g, 92%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.24-7.16(1H, m), 6.78(1H, s), 5.92(1H, m), 5.05(1H, m), 4.34(1H, m), 3.91-3.87(2H, m), 3.86(3H, s), 3.35-3.29(1H, m), 2.80(1H, m), 1.28-1.22(3H, m), 1.10-1.05(18H, m), 0.86(9H, s), 0.28(3H, s), 0.21(3H, s).

[0511] 工程5: 化合物22-5

上記工程4にて得られた化合物 (1. 20g, 1. 40mmol) と6-メトキシ-2-ナフチルボロソ酸 (0. 850, 4. 21mmol) を用いて、実施例3工程6と同様に反応させて目的物 (1. 06g, 88%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.72-7.69(2H, m), 7.59-7.51(3H, m), 7.30(1H, s), 7.16-7.07(2H, m), 6.82(1H, s), 5.94(1H, m), 5.06(1H, m), 4.34(1H, m), 3.99-3.95(1H, m), 3.93(3H, s), 3.88(3H, s), 3.46(1H, m), 2.94(1H, m), 1.30-1.23(3H, m), 1.12-1.07(18H, m).

2

[0512] 工程6: 化合物22-6

上記工程5にて得られた化合物 (1. 06g, 1. 23mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (612 71 得)

7)

[0513] 工程7: 化合物22-7

上記工程 得られた化合物 (0. 205g, 0. 290mmol) と実施例1工程11にて得られた化合物 (0. 255g, 0. 274mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (75g, 75g) を得た。

¹H-NMR (s) : 8. 1, 7.72(2, 7.67 55(, 7. 6-7 21(4

0514 工程 七合

上記工程7にて得られた化合物 (0.375g, 0.241mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.236g, 74%) を得た。

0515 工程 七合

上記工程8にて得られた化合物 (0.201g, 0.177mmol) を、実施例21工程6と同様に反応させ、目的物 (0.201g, 99%) を得た。

工程 合

上記工程9にて得られた化合物 (0.201g, 0.177mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.180g, 97%) を得た。

工程11 合

上記工程10にて得られた化合物 (0.0828mmol) 実施例3工
程8と同様に反応させ、 的 を得た

3)

s), 3.89(3H, s), 3.80(3H, s), 3.78-3.72(3H, m), 3.60-3.46(5H, m), 3.31-3.27(2H, m), 2.89-2.85(1H, m), 2.41(1H, m), 2.33-2.26(1H, m), 2.21-2.15(2H, m), 1.77-1.75(1H, m), 1.43(3H, m), 0.98(3H, m), 0.83(3H, m), 0.76-0.61(4H, m).

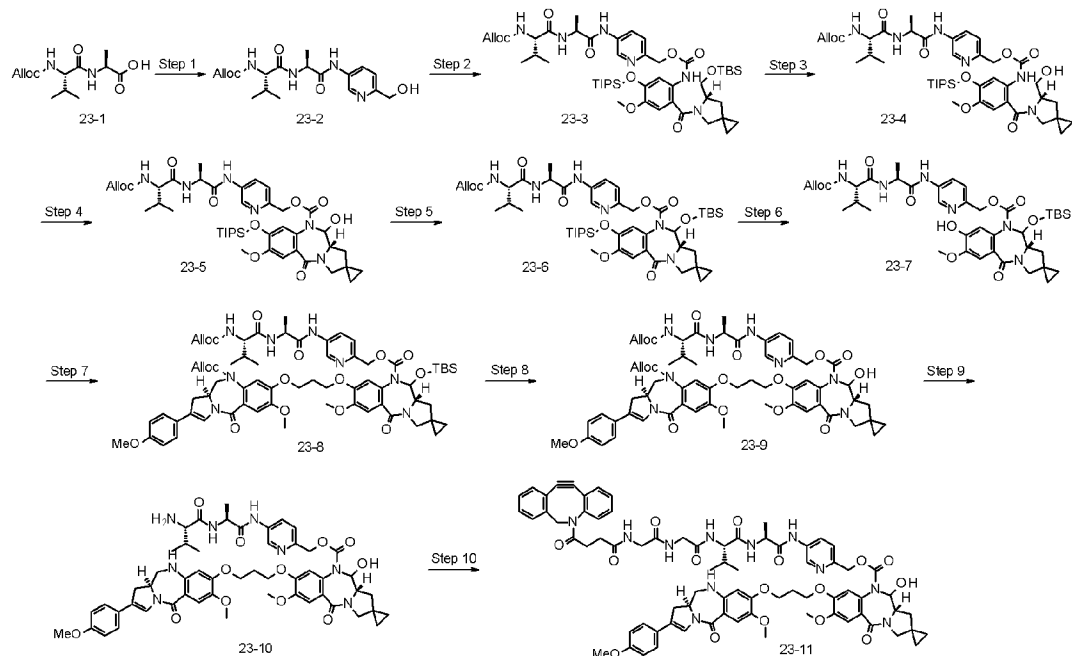
MS(APCI, ESI)m/z:1051(M+H)⁺

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

上記工程11にて得られた化合物 (0.065g, 0.062mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.048g, 54%) を得た。

実施 力

[化147]



工程1：化合物23-2

出発原料23-1 (14. 8g, 54. 4mmol, W02011130613) を、実施例5工程2と同様に反応させ、目的物 (12. 2g, 63%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 379 (M+H)⁺

[0520] 工程2：化合物23-3

上記工程1にて得られた化合物 (3.78g, 10.0mmol) を、実施例1工程6と同様に反応させ、目的物 (3.86g, 40%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 967 (M+H)⁺

[0521] 工程3：化合物23-4

上記工程2にて得られた化合物 (3.860g, 3.99mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、**2**を得た。

), 1.4

す。

17 (t) 。

[0522] 工程4：化合物23-5

上記工程3にて得られた化合物 (3. 11g, 3. 65mmol) を、実施例1工程8と

同様に反応させ、目的物 (2. 58g, 84%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9.02-8.88(1H, m), 8.69-8.59(1H, m), 8.17-8.02(1H, m), 7.22-7

. 17(1H, m), 7.02(1H, m), 6.79-6.78(2H, m), 6.63(1H, m), 5.95-5.87(2H, m), 5.33-

5.11(4H, m), 4.65-4.53(3H, m), 4.01(1H, m), 3.83(3H, s), 3.73(1H, m), 3.59(1H, m

), 3.32(1H, m), 2.43-2.39(1H, m), 2.18-2.16(1H, m), 1.75-1.67(2H, m), 1.48-1.4

3(3H, m), 1.20-1.14(3H, m), 1.10-0.94(24H, m), 0.73-0.60(4H, m)。

[0523] 工程5：化合物23-6

上記工程4にて得られた化合物 (2. 58g, 3. 03mmol) を、実施例1工程9と

同様に反応させ、目的物 (2. 75g, 94%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.78(1H, m), 8.58(1H, m), 8.03(1H, m), 7.21(1H, s), 6.97(1H, m)

, 6.73(1H, s), 6.59-6.55(1H, m), 6.02(1H, m), 5.93-5.85(1H, m), 5.32-5.04(4H, m

), 4.72-4.55(3H, m), 3.99(1H, m), 3.84(3H, s), 3.73-3.70(1H, m), 3.53(1H, m), 3.

28(1H, m), 2.36(1H, m), 2.21-2.14(1H, m), 1.55-1.53(1H, m), 1.47-1.44(4H, m), 1

. 23-1.16(3H, m), 1.10-1.00(18H, m), 0.98(3H, m), 0.94(3H, m), 0.83(9H, s), 0.81

-0.60(4H, m), 0.21-0.19(3H, m), 0.18-0.16(3H, m)。

[0524] 工程6：化合物23-7

上記工程5にて得られた化合物 (2. 75g, 2. 85mmol) を、実施例1工程10と

同様に反応させ、目的物 (2. 28g, 99%) を得た。

MS(APCI, ESI)^{m/z}: 809(M+H)⁺

[0525] 工程7：化合物23-8

上記工程6にて得られた化合物 (0. 340g, 0. 420mmol) を、実施例4工程9

と同様に反応させ、目的物 (0. 530g, 98%) を得た。

MS(APCI, ESI)^{m/z}: 1285(M+H)⁺

[0526] 工程8：化合物23-9

上記工程7にて得られた化合物 (0. 530g, 0. 412mmol) を、実施例3工程11

と同様に反応させ、目的物 (0.362g, 75%) を得た。

MS(APCI, ESI) m/z : 1171 (M+H)⁺

[0527] 工程9: 化合物23-10

上記工程8にて得られた化合物 (0.444g, 0.379mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.347g, 91%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1103 (M+H)⁺

[0528] 工程10: N-[4-((11,12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-

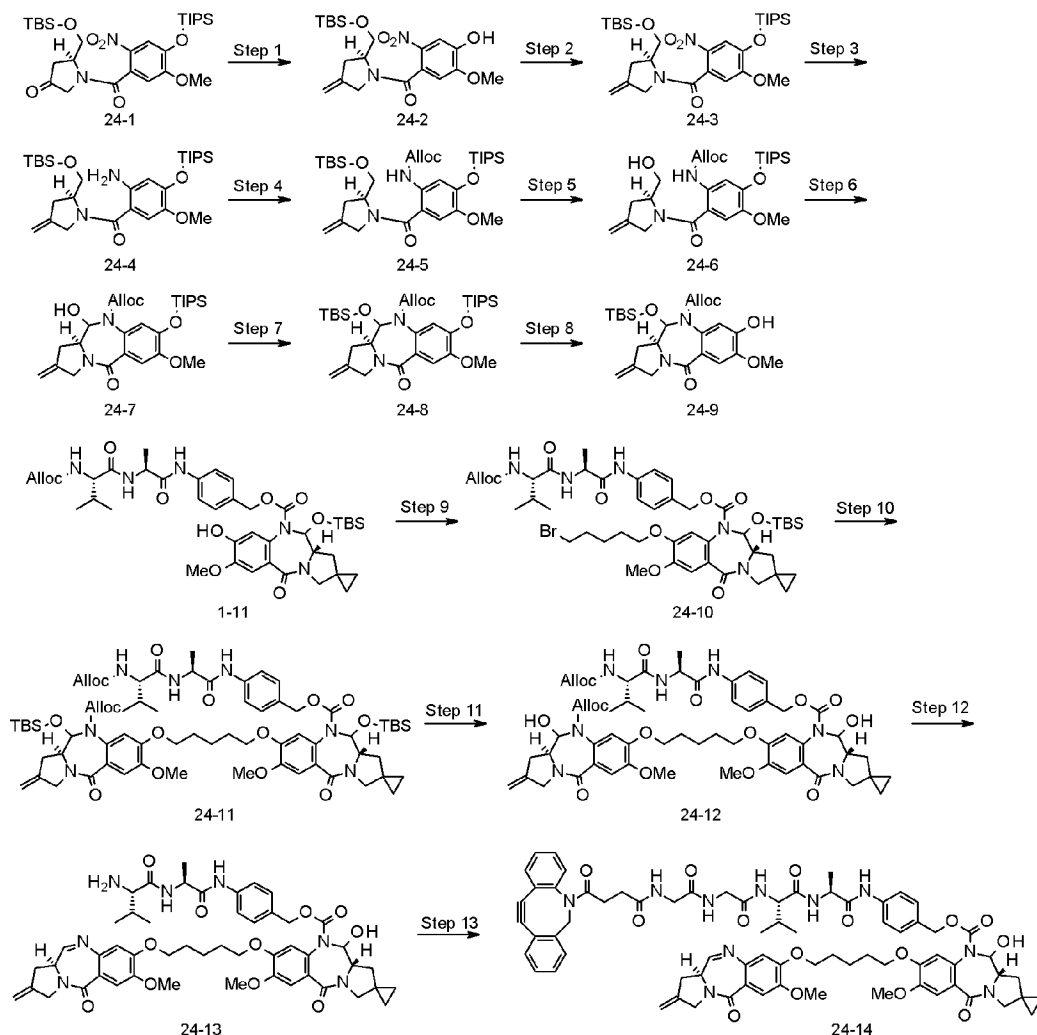
イル)-4-オキソプタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{6-[({[(11a,S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-{[(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]ピリジン-3-イル}-L-アラニンアミド

上記工程9にて得られた化合物 (0.100g, 0.0997mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.067g, 48%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1404 (M+H)⁺

[0529] 実施例24: 薬物リンカー22

[化 148]



工程 1 : 化合物 24-2

窒素雰囲気下、メチルトリフェニルフォスフォニウムブロマイド (7.28g, 20.4mmol) のテトラヒドロフラン (30ml) 懸濁溶液に、0℃にてカリウムtert-ブトキシド (2.06g, 18.3mmol) を少量ずつ加えた後、2時間撹拌した。化合物 24-1 (1.18g, 2.04mmol, WO2013053872) の THF (10ml) 溶液を2分間かけて滴下し、0℃にて28時間撹拌した。反応液に水、及びクエン酸水溶液を加えた後 (pH = 4.0)、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) ~ 0 : 100 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.450g, 52%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :423(M+H)⁺.

[0530] 工程2 :化合物 24-3

窒素雰囲気下、上記工程1にて得られた化合物 (0.668g, 1.58mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド (10ml) 溶液にイミダゾール (0.211g, 3.16mmol) を加えた。その後、トリイソプロピルシリルクロリド (0.502mL, 2.37mmol) を滴下し室温で6時間撹拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで2回抽出した。有機層層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー [ヘキサン :酢酸エチル = 100 :0 (v/v) → 50 :50 (v/v)] にて精製を行い、目的物 (0.520g, 57%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :579(M+H)⁺.

[0531] 工程3 :化合物 24-4

上記工程2にて得られた化合物 (0.520g, 0.898mmol) を、実施例17工程2と同様に反応させ、目的物 (0.478g, 97%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :547(M-H)⁺.

[0532] 工程4 :化合物 24-5

窒素雰囲気下、上記工程3にて得られた化合物 (0.478g, 0.871mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させた。減圧留去した後、得られた残渣 (0.570g) をこのまま次の反応に用いた。

[0533] 工程5 :化合物 24-6

上記工程4にて得られた化合物 (0.570g) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (0.446g, 95%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :519(M+H)⁺.

[0534] 工程6 :化合物 24-7

上記工程5にて得られた化合物 (0.446g, 0.859mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (0.196g, 44%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ :7.19(1H, s), 6.68(1H, s), 5.78-5.76(1H, m), 5.55(1H, m), 5.19-5.13(4H, m), 4.61-4.58(1H, m), 4.49-4.46(1H, m), 4.29(1H, m), 4.15(1H, m), 3.85

61 (1H	-2	
2	(1	
MS(APCI、ESI)m/z:517(M+H) ⁺ .		
[0535] 工程7: 化合物24-8		
上記工程6にて得られた化合物 (0. 195g, 0. 377mmol) を、実施例1工程9		
と同 (c) 応 230g, 7 を得た		
¹ H-NMR (δ)	5. 5	5 (1
	5. 2	5 2
(4	(1	2 (1
(1	4 (1	(1
s	2	s
[0536] 工程8: 化合物24-9		
上記工程7にて得られた化合物 (0. 230g, 0. 365mmol) を、実施例1工程10		
と同様に反応させた。本工程では、反応終了後、分液操作を行い、有機溶媒		
を減圧留去して得られた粗生成物 (0. 238g, 定量的) を次の反応に用いた。		
[0537] 工程9: 化合物24-10		
上記工程で得られた化合物と実施例1工程10にて得られた化合物 (0. 251g		
, 0. 311mmol) を、実施例3工程2と同様に反応させ、目的物 (0. 185g, 62%		
) を得た。		
MS(APCI、ESI)m/z:958[⁸¹ Br, (M+H) ⁺], 956[⁷⁹ Br, (M+H) ⁺].		
[0538] 工程10: 化合物24-11		
上記工程8にて得られた化合物 (0. 0660g, 0. 139mmol) と上記工程9にて		
得られた化合物 (0. 133g, 0. 139mmol) を実施例3工程10と同様に反応させ		
、目的物 (0. 123g, 66%) を得た。		
MS(APCI、ESI)m/z:1350(M+H) ⁺ .		
[0539] 工程11: 化合物24-12		
上記工程10にて得られた化合物 (0. 123g, 0. 0910mmol) を、実施例3工程		
11と同 (c) い、的 を得た		
¹ H-NMR (δ)	8. 5	2
	1-7	2
	23	21

工程12 重合

上記工程にて得られた化合物 (0.847mmol) 実施例3工程12と同様に反応させ、 的を得た

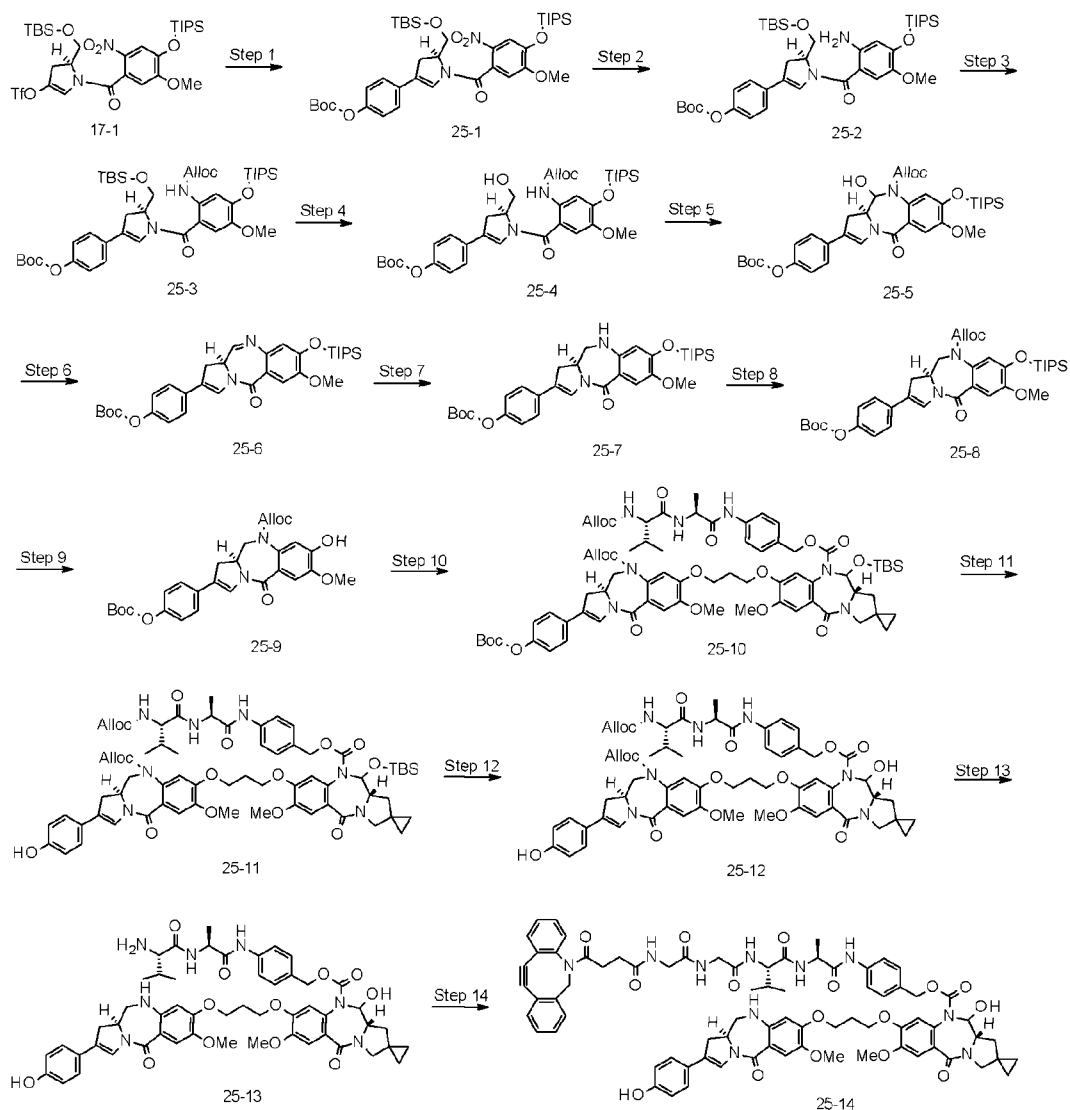
66 (6H,

工程 ジデヒド ジンゾ アゾ ン-5
 ーイ オキシブタノイル] グ シレグ シレ バリル
 , , ヒドロキシ 7' キシ ,
 , チ デン オキシ テ ラ
 ヒドロ-1H-ピロロ 1-c] ンゾジアゼピン イ オキ
 シ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-ス
 ピ シロ ロ パ , ピロロ 1-c] 1, 4] ン アゼビ
 ン イレ] カルボニ ャンノ チ フェニ
 アラニンアミド

上記工程12にて得られた化合物 mmol 実施例3工程

程 と 同 (c) 1		的		0759,		得	
¹ H-NMR DN		(1H	2	2	7-	4-7	4-7
(3H,)		7.44(	7.5				
5.1H		.7 (1	.77	.7			
(1		.7	(1				
11(2H m), 4.							
(1		14	012	2	52(4	14-4.	2
5		, 1.	5	5	5		
2(4							
MS(APCI, ESI)m/z:1337(M+H) ⁺ .							
[0542] 実施例25：薬物リシカ-23							

[化 149]



工程 1 :化合物 25-1

出発物質 17-1 (3.81g, 5.34mmol) と tert -ブチル 4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボラン-2-イル)フェニルカルボネート (5.13g, 16.0mmol) を実施例 3 工程 6 と同様に反応させ、目的物 (3.05g, 75%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z :757(M+H)⁺.

[0543] 工程 2 :化合物 25-2 上記工程 1 にて得られた化合物 (3.05g, 4.09mmol) を、実施例 17 工程 2 と同様に反応させ、目的物 (2.67g, 91%) を得た。

、
27)

要

[0544] 工程3：化合物25-3

上記工程2にて得られた化合物 (2. 67g, 3. 67mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させた。本工程では、反応終了後、分液操作を行い、有機溶媒を減圧濃縮して得られた粗生成物 (3. 00g, 定量的) をそのまま次の反応に用いた。

[0545] 工程4：化合物25-4

上記工程3にて得られた化合物 (3. 05g) を、実施例1工程7と同様に反応を行ない、目的物 (2. 67g, 定量的) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.34(1H, m), 7.70(1H, m), 7.24(2H, m), 7.12(2H, m), 6.86(1H, s), 6.84(1H, s), 5.95-5.89(1H, m), 5.31(1H, m), 5.21(1H, m), 4.87-4.86(1H, m), 4.61-4.61(2H, m), 4.41(1H, m), 3.93-3.90(2H, m), 3.76(3H, s), 3.29(1H, m), 2.68-2.66(1H, m), 1.55(9H, s), 1.33-1.26(3H, m), 1.13-1.11(18H, m). MS(APCI, ESI) m/z: 697(M+H)⁺.

[0546] 工程5：化合物25-5

上記工程4にて得られた化合物 (1. 22g, 1. 75mmol) を、実施例9工程3と同様に反応させ、目的物 (0. 838g, 69%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.45(1H, s), 7.37(2H, m), 7.22(1H, s), 7.15(2H, m), 7.11-7.09(1H, m), 6.72(1H, s), 5.82-5.79(1H, m), 5.19-5.16(2H, m), 4.61-4.59(2H, m), 4.50-4.47(1H, m), 4.00(1H, m), 3.86(3H, s), 3.41-3.28(1H, m), 3.09-3.05(1H, m), 1.57(9H, s), 1.29-1.25(3H, m), 1.14-1.07(18H, m). MS(APCI, ESI) m/z: 695(M+H)⁺.

[0547] 工程6：化合物25-6

上記工程5にて得られた化合物 (0. 838g, 1. 21mmol) を、実施例3工程12と同 (c)) の 745g, 的 得た

¹H-NMR (l₃) 5 (1) 48-7.1 (1) 1 2

2 (1)

1 m

57 s 2 (1)

(1)) 、

+

[0548] 工程7～9：化合物25-9

上記工程6にて得られた化合物(0.745g、1.26mmol)を、実施例3工程8、工程9および実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0.516g、3工程収率78%)を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.72-8.50 (1H, m), 7.52 (1H, s), 7.40-7.38 (4H, m), 7.23-7.21 (2H, m), 7.16 (2H, m), 7.09 (1H, m), 6.84-6.82 (2H, m), 6.51-6.49 (1H, m), 6.02 (1H, m), 5.92-5.90 (1H, m), 5.30-5.21 (5H, m), 4.71-4.61 (6H, m), 4.36-4.24 (5H, m), 4.02-4.00 (3H, m), 3.93-3.88 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.71 (2H, m), 3.51-3.49 (1H, m), 3.32-3.28 (2H, m), 2.72 (1H, m), 2.37-2.34 (3H, m), 2.16-2.13 (1H, m), 1.6 (9H, s), 1.50-1.46 (4H, m), 0.97-0.93 (7H, m), 0.82 (9H, s), 0.68-0.65 (4H, m), 0.20 (3H, s), 0.14 (3H, s). MS (APCI, ESI) m/z: 523 (M+H)⁺.

[5 工程1 化合 25

上記工程9にて得られた化合物 (0.105g, 0.200mmol) と実施例1工程11にて得られた化合物 (0.186g, 0.200mmol) を実施例3工程10と同様にカップリング反応させ、目的物 (0.248g, 90%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.72-8.50 (1H, m), 7.52 (1H, s), 7.40-7.38 (4H, m), 7.23-7.21 (2H, m), 7.16 (2H, m), 7.09 (1H, m), 6.84-6.82 (2H, m), 6.51-6.49 (1H, m), 6.02 (1H, m), 5.92-5.90 (1H, m), 5.30-5.21 (5H, m), 4.71-4.61 (6H, m), 4.36-4.24 (5H, m), 4.02-4.00 (3H, m), 3.93-3.88 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.71 (2H, m), 3.51-3.49 (1H, m), 3.32-3.28 (2H, m), 2.72 (1H, m), 2.37-2.34 (3H, m), 2.16-2.13 (1H, m), 1.6 (9H, s), 1.50-1.46 (4H, m), 0.97-0.93 (7H, m), 0.82 (9H, s), 0.68-0.65 (4H, m), 0.20 (3H, s), 0.14 (3H, s). MS (APCI, ESI) m/z: 1370 (M+H)⁺.

[0550] 工程11：化合物25-11

上記工程11で得た化合物 (0.248g, 0.181mmol) のジクロロメタン (3mL) 溶液にピペリジン (3mL) を加え、室温で2時間攪拌した。反応液をクエン酸水溶液で希釈し、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸 トリウムで乾燥した。過後、有機溶媒を減圧留し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム：メタノール=100：10 ()] にて精製を行い、目的物 (0.5 g, 93%) を得た。

δ

), 5.5 (3H, s), 3.66-3.64 (3H, m), 4.01-3.99 (2H, m), 3.86 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.72 (2H, m), 3.66-3.64 (1H, m), 3.51-3.48 (1H, m), 3.28 (2H, m), 2.67 (1H, m), 2.37-2.12 (4H, m), 1.55-1.52 (2H, m), 1.45-1.42 (4H, m), 0.95-0.91 (6H, m), 0.81 (9H, s), 0.81-0.78 (2H, m), 0.68-0.65 (3H, m), 0.20-0.15 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 1270 (M+H)⁺.

[1] 工程12: 化合物25-12

上記工程11で得た化合物 (0.175g, 0.138mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.162g, 定量的) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1156 (M+H)⁺.

[] 工程13: 化合物25-13

上記工程12にて得られた化合物 (0.116g, 0.100mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.0410g, 41%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 988 (M+H)⁺.

[] 工程14: N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[({ [(11a' S)-11'-ヒドロキシ-8'-(3-{ [(11aS)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-7-メトキシ-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ)-7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン]-10' (5' H)-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル}-L-アラニンアミド

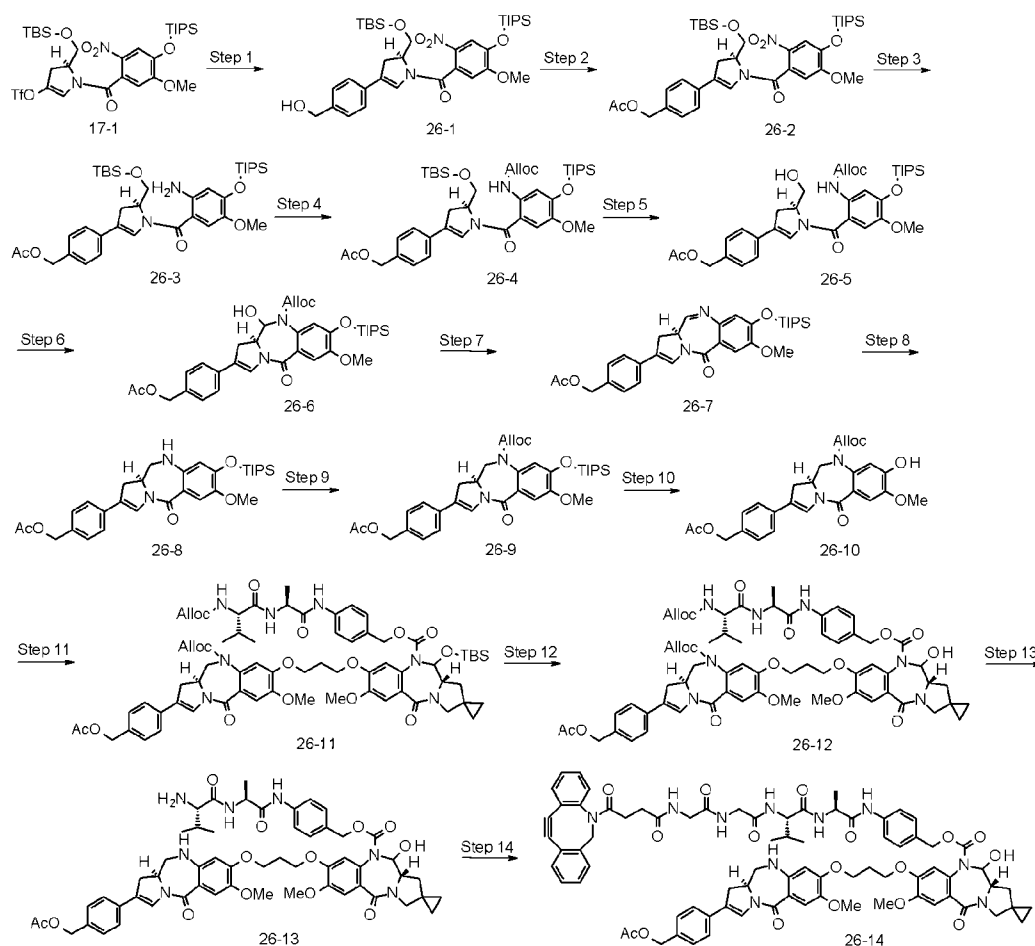
上記工程13にて得られた化合物 (0.00500g, 0.00506mmol)、実施例2工程2にて得られた化合物 (0.0100g, 0.0202mmol) をジクロロメタン (0.3mL) とメタノール (0.3mL) に溶解し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (

3. 5 μ L, 0.0202mmol) を加え、室温で1時間撹拌した。反応液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : CMW = 100 : 0(v/v) → 0 : 100(v/v)] にて精製を行い、目的物 (0.00350g, 50%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1389 (M+H)⁺.

[0554] 実施例26 : 薬物リンカー24

[化150]



工程1 : 化合物26-1 出発物質17-1 (3.93g, 5.51mmol) と4-(ヒドロキシシメチル)フエニルボロン酸を実施例3工程6と同様に反応させ、目的物 (3.09g, 84%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 671 (M+H)⁺.

[0555] 工程2 : 化合物26-2

上 程5 比化合 885g, 1. mm を、実 9工程3及
ひ実例 程 2と同 にさせ の 515g, 得7
MS (APCI、ESI) m/z : 549 (M+H) $^{+}$.

上記工程7にて得られた化合物 (0.515g, 0.983mmol) を、実施例3工程8、工程9及び実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (0.448g, 定量的) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.51(1H, s), 7.37-7.30(4H, m), 7.26-7.25(1H, m), 6.82(1H, s), 5.94(1H, s), 5.86-5.79(1H, m), 5.15-5.13(1H, m), 5.09(3H, s), 4.61(1H, m), 4.48-4.46(1H, m), 4.35-4.32(1H, m), 4.25-4.23(1H, m), 3.96(3H, s), 3.64(1H, d, m), 3.33-3.29(1H, m), 2.73(1H, m), 2.11(3H, s).

MS(APCI, ESI)m/z: 479(M+H)⁺.

[0561] 工程11: 化合物26-11

上記工程10にて得られた化合物 (0.0690g, 0.144mmol) と実施例1工程11にて得られた化合物 (0.134g, 0.144mmol) を実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.118g, 62%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z: 1325(M+H)⁺.

] 工程12~13: 化合物26-13

上記工程11にて得られた化合物 (0.134g, 0.101mmol) を、実施例3工程1及び実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.0950g, 二工程収率90%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 9.14(1H, s), 7.91(1H, m), 7.69(1H, s), 7.47(4H, m), 7.40-7.38(2H, m), 7.34-7.32(2H, m), 7.21(1H, s), 7.18(2H, m), 7.13(2H, m), 6.40(1H, s), 6.08(1H, s), 5.88(1H, m), 5.36(1H, m), 5.09(2H, s), 4.72(1H, m), 4.62-4.59(2H, m), 4.35-4.32(1H, m), 4.12-4.07(4H, m), 3.89(3H, s), 3.80(3H, s), 3.74-3.71(2H, m), 3.58-3.53(3H, m), 3.41-3.38(1H, m), 3.31-3.29(2H, m), 2.78-2.74(1H, m), 2.41(1H, m), 2.31-2.31(1H, m), 2.18-2.15(1H, m), 2.11(3H, s), 1.76(1H, m), 1.44-1.42(3H, m), 0.99(3H, m), 0.83(3H, m), 0.71-0.66(4H, m).

MS(APCI, ESI)m/z: 1044(M+H)⁺.

[0563] 工程14: N-[4-(11, 12-ジフェトリロジペンゾ[b, f]アゾシネ-5(6H)-イリ)-4-オキソゾタノイル]アリシルグリシリル-L-バリル-N-{4-

イリ)-4-オキソゾタノイル] (11a' S) -8' - (3- { [(11a S) -2- {4- [(アセチルオキ

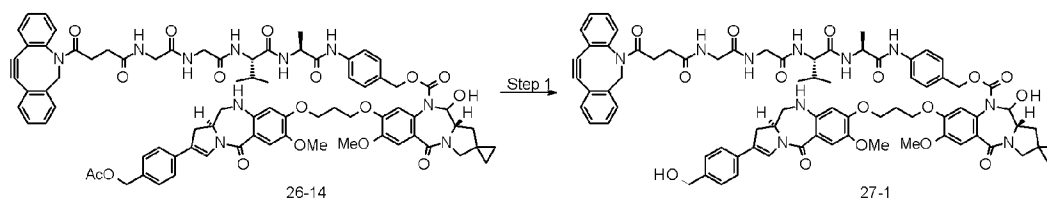
シ) メチル} フエニル} _ 7-メトキシ-5_ オキソ_ 5, 10, 11, 11a-テ
 ラヒドロ_ 1H_ ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_ イル} オ
 キシ} プロボキシ) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ_5' -オキソ-11
 , , 11a' -ジヒドロ_ Γ H_ スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2
 , 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル} カルボニル}
 オキシ) メチル} フエニル} _ L-アラニンアミド

上記工程 13 にて得られた化合物 (0.0700g, 0.0670mmol) を、実施例 3 エ
 程 13 と同様に反応させ、目的物 (0.0520g, 54%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1445 (M+H) +.

[0564] 実施例 27 : 薬物 リンカー 25

[化 151]



工程 1 : N_ [4- (11, 12_ ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)
 -イル) _ 4-オキソプタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N- [4_
 [({ [(11a, S) - 11' -ヒドロキシ-8' - [3- ({ (11aS) _2_ [4
 - (ヒドロキシメチル) フエニル] _ 7-メトキシ-5_ オキソ_ 5, 10, 11,
 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_
 イル} オキシ) プロボキシ] _7' -メトキシ_5' -オキソ-1Γ , 11a' -
 ジヒドロ_ Γ H_ スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1
 , 4] ベンゾジアゼピン] _ 10' (5' H) -イル} カルボニル} オキシ) メチ
 ル} フエニル} -L-アラニンアミド

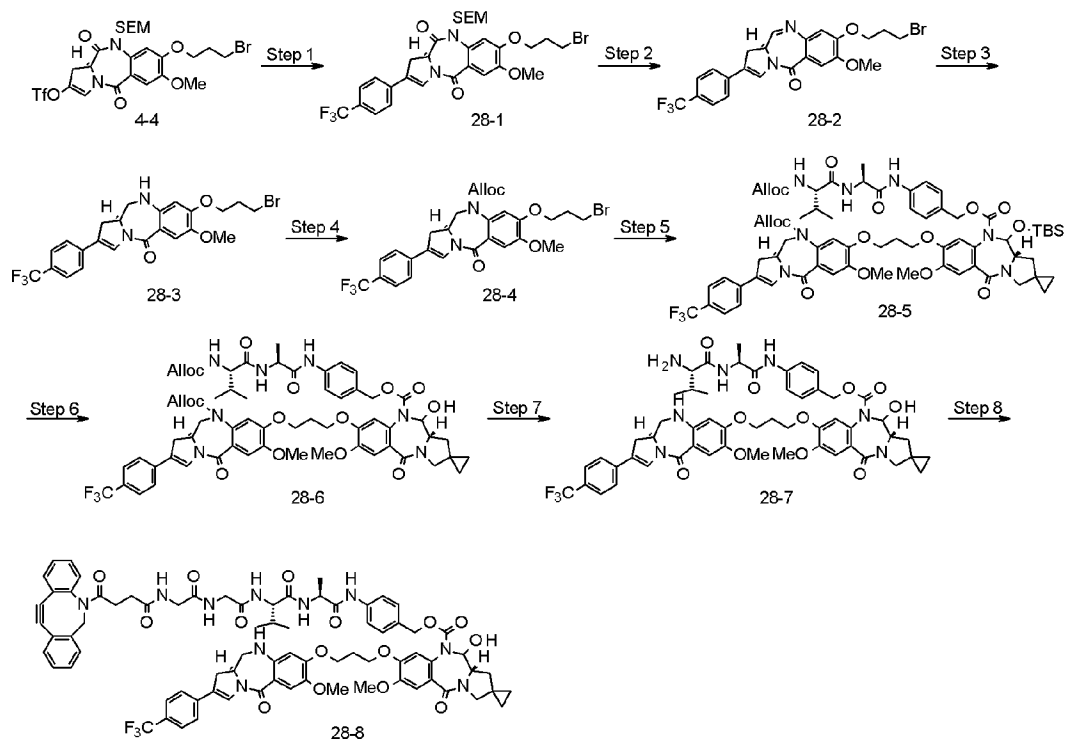
実施例 26 工程 14 にて得られた化合物 (0.0230g, 0.0159mmol) のメタノー
 ル (2mL) 溶液に 1 規定の水酸化ナトリウム溶液 (0.0175mL, 0.0175mmol)
 を加え室温で 1 時間攪拌した。さらに 1 規定の水酸化ナトリウム溶液 (0.0175
 mL, 0.0175mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液に 1 規定の塩酸水

溶液 (0.0350m l)、及び水を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : CMW=100 : 0(v/v) → 0 : 100(v/v)] にて精製を行い、目的物 (0.0190g, 85%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1403 (M+H)⁺.

[0565] 実施例 28 : 薬物 リンカー 26

[化 152]



工程 1 : 化合物 28-1

実施例 4 工程 4 にて得られた化合物 (1.12g, 1.70mmol) と 4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボラン-2-イル)トリフルオロメチルベンゼン (0.924g, 3.40mmol) を、実施例 3 工程 6 と同様に反応させ、目的物 (0.918g, 83%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 657[⁸¹Br, (M+H)⁺], 655[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0566] 工程 2 : 化合物 28-2

上記工程 1 にて得られた化合物 (0.918g, 1.40mmol) を、実施例 3 工程 7 と

同様に反応させ、目的物 (0.425g, 60%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 511 [⁸¹Br, (M+H)⁺], 509 [⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0567] 工程3 : 化合物 28-3

上記工程2にて得られた化合物 (0.425g, 0.834mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させた。分液操作後、減圧留去し、得られた化合物 (0.410g) をそのまま次の反応に用いた。

[0568] 工程4 : 化合物 28-4

上記工程2にて得られた化合物 (0.425g, 0.834mmol) を、実施例3工程8及び実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (0.420g, 85%) を得た。MS(APCI、ESI)m/z : 597 [⁸¹Br, (M+H)⁺], 595 [⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0569] 工程5 : 化合物 28-5

上記工程4にて得られた化合物 (0.0960g, 0.160mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.212g, 99%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1321 (M+H)⁺.

[0570] 工程6 : 化合物 28-6

上記工程5にて得られた化合物 (0.210g, 0.159mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.162g, 84%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1208(M+H)⁺.

[0571] 工程7 : 化合物 28-7

上記工程6にて得られた化合物 (0.160g, 0.132mmol) を用いて実施例3工程12と同様に反応を行ない、目的物 (0.103g, 75%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 1039(M+H)⁺.

[0572] 工程8 : N-[4-((11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-

イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-

[({ [(11a, S) - 11' - ヒドロキシ-7' - メトキシ-8' - [3- ({ (11aS) - 7-メトキシ-5-オキソ-2- [4- (トリフルオロメチル) フェニル] -5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル} オキシ) プロボキシ] -5' - オキソ-1H, 11a'

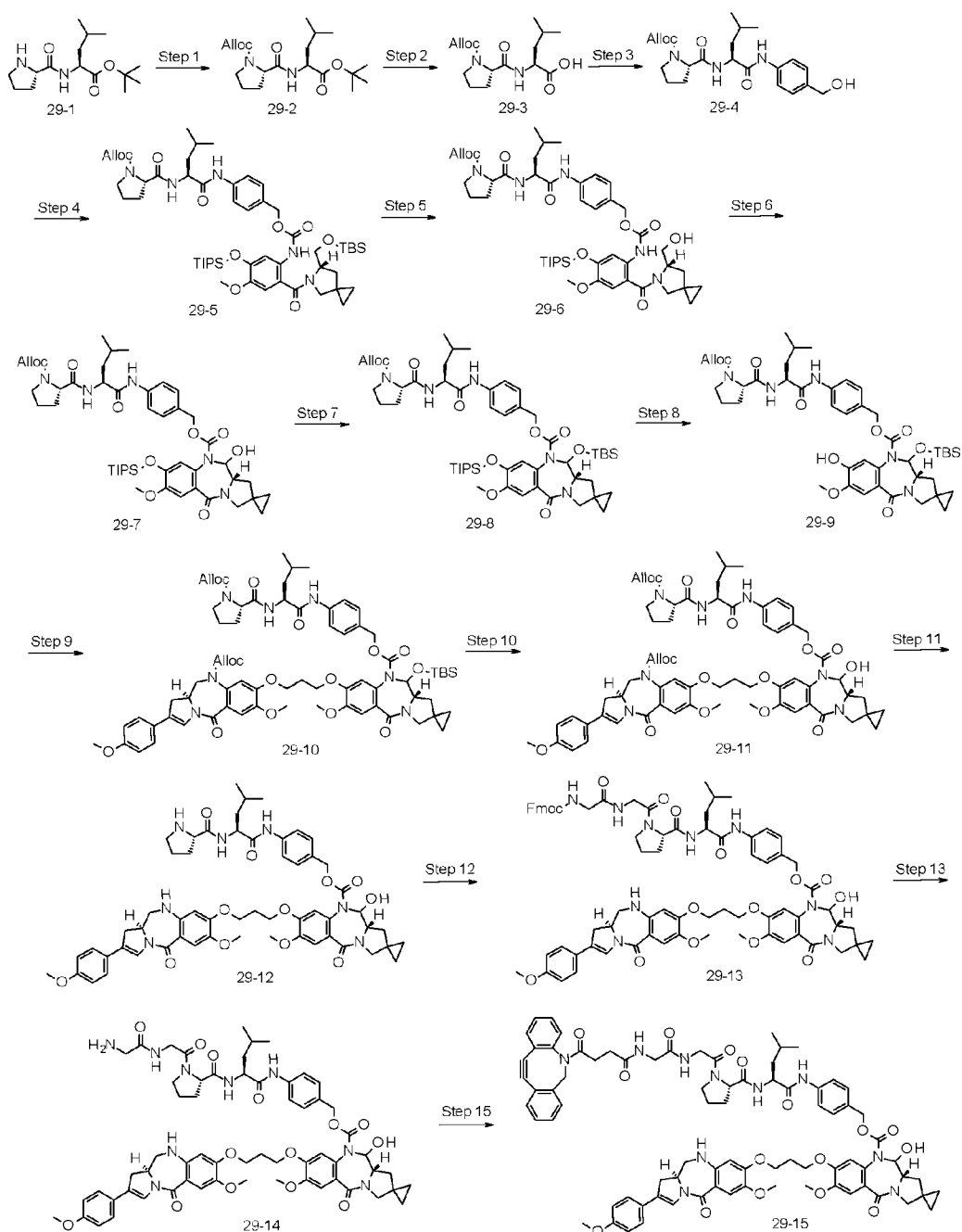
—ジヒドロ—Γ—H—スピロ[シクロプロパン—1,2'—ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]—10'—(5'H)—イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}—L—アラニンアミド

出発原料4-4を上記工程7にて得られた化合物(0.101g, 0.0971 mmol)を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物(0.107g, 76%)を得た。

MS (APCI、ESI) m/z :1441 (M+H)⁺.

[0573] 実施例29 :薬物リンカー27

[化 153]



工程 1 :tert - ブチル 1_ [(プロップ_2_ エン-1_ イルオキシ) カルボニ
ル] -L- プロリル-L-ロイシネート

tert - ブチル - L - プロリン - L - ロイシネート (4. 64g , 16. 3mmol) を、
ピリジンの代わりに トリエチルアミン (3. 41mL, 24. 5mmol) を用いて、実
施例3工程9と同様に反応させた。反応終了後、分液操作をし、有機溶媒を減

圧留去しすることで得られた化合物 (5. 79g , 96%) をそのまま次の反応に用いた。

[0574] 工程2: 1- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-プロリン-L-ロイシン

上記工程1にて得られた化合物 (5. 79g , 15. 7mmol) のジクロロメタン (60mL) 溶液にトリフルオロ酢酸 (20mL) を加え、室温で1時間撹拌した。反応液にトルエンを加え減圧留去することにより、得られた化合物 (2. 69g , 55%) をそのまま次の反応に用いた。

[0575] 工程3: 1- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-プロリン-N- [4- (ヒドロキシメチル) フェニル] -L-ロイシンアミド

上記工程2にて得られた化合物 (6. 10g, 19. 5mmol) のTHF (100mL) 溶液にN-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (5. 07g , 20. 5mmol) を加え、室温で1時間撹拌した。4-アミノベンジルアルコール (2. 16g , 20. 5mmol) を加え、一晩撹拌した。反応液を減圧留去し、得られた残渣を酢酸エチルに溶解した。希塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 90 : 10 (v/v) ~ 0 : 100 (v/v)] にて精製し、目的物 (1. 60g, 20%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8. 62-8. 33 (1 H, m), 7. 68-7. 49 (2H, m), 7. 31-7. 30 (2H, m), 6. 66-6. 43 (1 H, m), 5. 97-5. 70 (1 H, m), 5. 39-4. 96 (2H, m), 4. 64-4. 53 (5H, m), 4. 40-4. 35 (1 H, m), 3. 57-3. 50 (2H, m), 2. 20-2. 19 (2H, m), 1. 98-1. 97 (3H, m), 1. 66-1. 64 (3H, m), 0. 97-0. 94 (6H, m) .

MS (APCI , ESI) m/z : 418 (M+H)⁺ .

[0576] 工程4: 1- [(プロプ-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-プロリン-N- [4- ({ [(2- { [(6S) -6- ({ [tert -ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} メチル) -5- アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] カルボニル} -4-メトキシ-5- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ

} フェニル) カルバモイル] オキシ} メチル) フェニル] -L-ロイシンアミド

上記工程3に 得られた化合物 (0. 01mmo 実施例1工程6と同様に反応させ、目的物 (0. 535g, 37%) を得た。

. 05-0. 04(6H, m).

程 ルオキシ) カルボニル] -L-プロ
リル (1 ' ' ヒドコ シ ' キシ
5' -オキソ-8' - { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -11'
, 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1
ンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキ
チ フェニ コ う ミド

上記工程4にて得られた化合物 (0. 535g, 0. 531mmol) を、実施例1工程7及び実施例9工程3と同様に反応させ、目的物 (0. 367g, 78%) を得た。

(,), . (,), . (,), . , ,), . (,)
97-0. 93(6H, m), 0. 71-0. 64(4H, m).

MS(APCI、ESI) m/z : 890(M+H)⁺.

工程7: 1- [(プロパン-2-エン-1-イルオキシ) カルボニル] -L-プロリ

1 (1 ' ' チル (ジメチ

リル] オキシ} _7' —メトキシ_5' —オキソ—8' - { [トリ (プロパン—
2_イル) シリル] オキシ} - 11' , 11a' —ジヒドロ_Γ H_スピロ [シク
ロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _10'
(5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—ロイシニア
\$ ド

上記工程6にて得られた化合物 (0. 367g , 0. 412mmol) を用いて実施例1エ
程9と同様に反応を行ない、目的物 (0. 181g , 44%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8. 54(1 H, s), 7. 52-7. 45(2H, m), 7. 19(1 H, s), 7. 14(2H, m), 6. 71-
6. 68(1 H, m), 6. 61(1H, s), 6. 01(1H, m), 5. 94-5. 92(1 H, m), 5. 34-5. 17(2H, m), 4. 77
(1H, m), 4. 64-4. 56(3H, m), 4. 38-4. 35(1 H, m), 3. 85(3H, s), 3. 72-3. 69(1 H, m), 3. 5
5-3. 46(3H, m), 3. 27(1 H, m), 2. 35(1 H, m), 2. 21-2. 18(2H, m), 1. 97-1. 95(3H, m), 1.
54-1. 51(2H, m), 1. 16-1. 09(5H, m), 1. 02-1. 01(18H, m), 0. 97-0. 93(6H, m), 0. 81(9
H, s), 0. 68-0. 63(4H, m), 0. 19(3H, s), 0. 09(3H, s) .

[0579] 工程8 : 1— [(プロプ—2—エン_1_イルオキシ) カルボニル] _L—プロリ
ル—N_ {4_ [({ [(11a' S) - 11' - { [tert _プチル (ジメチル) シ
リル] オキシ} _8' —ヒドロキシ—7' —メトキシ_5' —オキソ—1Γ , 11
a' —ジヒドロ_Γ H_スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1- c
] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ
) メチル] フェニル} —L—ロイシニアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0. 181g , 0. 180mmol) を、実施例1工程10
と同様にさせ、目的物 (0. 153g , 定量的) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8. 57-8. 27(1 H, m), 7. 69-7. 41(2H, m), 7. 23(1 H, s), 7. 12(2H, m),
6. 69-6. 66(1 H, m), 6. 64(1 H, s), 5. 99-5. 92(3H, m), 5. 34-5. 19(3H, m), 4. 81(1H, m)
, 4. 63-4. 57(4H, m), 4. 38-4. 36(1 H, m), 3. 94(3H, s), 3. 71(1H, m), 3. 54-3. 52(3H, m
) , 3. 27(1 H, m), 2. 35(1 H, m), 2. 19(2H, m), 1. 97-1. 95(3H, m), 1. 55-1. 52(2H, m), 0.
97-0. 93(6H, m), 0. 81(9H, s), 0. 76-0. 61(4H, m), 0. 21(3H, s), 0. 09(3H, s) .

MS(APCI、ESI)m/z : 848(M+H)⁺.

[0580] 工程9 : 1— [(プロプ—2—エン_1_イルオキシ) カルボニル] _L—プロリ

{ } - 1 - ロイシフミト

フセベ [- 10'] (5' H) - イル] カルボニル} おキシ) メチル] エニル

H-スロロ [シクろぶろノベ], 2' - ーロロ [2, 1 - c] [1, 17] , 1, 17]

- イル} おキシ) フロボキシ] - 6' - オキソ-11' , 11a' - ジレトロ - 1'

, 11a-エトラトロ _H-ロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジフセベソ-

キソ - 10 - [(ぶろフ-2-エソ-1-イルおキシノ) カルボニル] - 6, 10, 11

, - [3 - ({ (11as) -7-メトキシ -Z - (4-メトキシエニル) -6-オ

リル -N - {4 - [({ (11a' S) - 11' - ーロロキベ-4, -メトキシ -8

[L8S0] [0 : 1 - [(ぶろフ-2-エソ-1-イルおキシノ) カルボニル] - 1 - フ

(SI/% 13dV、 SI/m/z : 13274(H+I)% "+

s), 0, .0, 69-0.069 (LH7, Φ, 0.19 (Φ, s), 0.13 (Φ, s).

9-マ 16 (E_Hm), 1.94 ト 1.94 (2H, m) に, 1.94 ト 1.94 (2H, m), 0.96-0.92 (7H, Φ, 0.81 (9H,

) , 3.63-3.60 (4H, Φ, 1.9, 3.82-3.26 (2H, m), Z, 7.7-7.68 (1H, Φ, Δ, 3.7-2.34 (4H, m), 2.1

, 4.22-4.19 (E_Hm), 4.01-3.99 (1H, Φ, 1.9, 3.88 (E_Hs), 3.84-3.81 (6H, Φ, 1.9, 7.1 (2H, ω

3H, Φ, 6.06-6.03 (2H, m), 4.1 P-P, 7.1 (1H, m), 4.62-4.71 (4H, m), 4.36 - 《 ま (H, m)

6.817 (1H, m), 6.03-6.01 (1H, Φ, 6.92-6.88 (1H, Φ, 6.75-5.72 (1H, Φ, 6.28-6.26 (

H, m), 7.23-7.21 (E_Hm), 7.13-7.11 (ZH, m), 6.88 (2H, m), 6.28-6.80 (1H, Φ, 6.60-

1H-NMR(CDCl₃) δ : 8.79 (1H, s), 7.54, 7.61 (1H, m), 7.39, 7.30-7.29 (2

層様に反' させ' 目%物 (φ, 137B, 61%) を得た。

層己エ %8にエ得%れ、化号物 (0, 163g, 0, 180mmol) を率%収4工 %9マ

ポニム} オキシ) × (-l)] エニル} -ローロイシフミト

ロロ [2, 1 - c] [1, 17] , 1, 17] ベンゾジフセベソ] - 10' (6' H) - イル] カ

オキソ - 11' , 11a' - ジレトロ, H-スロロ [シクろぶろノベ], 2' -

1 - c] [1, 17] , 1, 17] ベンゾジフセベソ-8-イル} おキシ) フロボキシ] - 6' -

ルオキシ) カルボニル] - 6, 10, 11, 11a-エトラトロ _H-ロロ [2,

- (4_ズトキシエニル) - 5 - オキソ - 10 - [(ぶろフ-2-エベ-1-イ

リル] オキシ} -オ -ズトキシ -8' - [3 - ({ (11as) -4-ズトキシ -2

ル-N- {4- [({ (11a' S) - 11' - { [tert-ブチル (シズチル) >

上記工程9にて得られた化合物
実施 程
と同様に反応させ、目的物 (0. 116g, 93%) を得た。

(3H, s), 3. 85-3. 83(6H, m), 3. 72(2H, m), 3. 62-3. 56(4H, m), 3. 32-3. 29(2H, m), 2. 7
0(1H, m), 2. 45-2. 38(2H, m), 2. 30-2. 27(2H, m), 2. 20-2. 10(3H, m), 1. 94-1. 89(4H,
m), 1. 75-1. 71(2H, m), 0. 95(7H, m), 0. 72-0. 66(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z:1210(M+H)⁺.

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

上記工程10にて得られた化合物 (0. 116g, 0. 0958mmol) を、実施例3工程
12と同様に反応させ、目的物 (0. 0530g, 53%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9. 15(1H, s), 8. 11(1H, m), 7. 50-7. 45(4H, m), 7. 32-7. 31(2H, m),
7. 21(1H, s), 7. 13(2H, m), 6. 89(2H, m), 6. 37(1H, s), 6. 08(1H, s), 5. 88(1H, m), 5. 3
8(1H, m), 4. 69(1H, m), 4. 63-4. 60(1H, m), 4. 53-4. 51(1H, m), 4. 31-4. 28(1H, m), 4.
13-4. 08(3H, m), 3. 89(3H, s), 3. 83(3H, s), 3. 81(3H, s), 3. 75-3. 70(4H, m), 3. 57-3

[0583] 工程12 : N- [(9H-フルオレン-9-イルオキシ) カルボニル] グリシルグ

リシル-ル-ゾリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11' -ヒドロキシ-7
 ' -メトキシ-8' - (3- { [(11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフ
 エニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-チトラヒドロ [2, 1-
 c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} フロボキシ) -5' -オキ
 ソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパペン-1, 2' -ピロ
 ロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニ
 ル} オキシ} メチル] フェニル} -ル-ロイシンアミド

上記工程11にて得られた化合物 (0.0410g, 0.0393mmol) と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 (0.0410g,
 0.0393mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (1mL) 溶液に、1-ヒドロキシ
 ベンゾトリアゾール-水合物 (0.00602g, 0.00393mmol) 及び1-エチル-
 3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (0.00905g, 0.0
 472mmol) を加え室温で1時間攪拌した。減圧留去し、得られた残渣をシリカ
 ギルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム: メタノール=100:0~90:1
 0) にて精製を行ない、目的物 (0.0520g, 94%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.57(1H, s), 7.77-7.75(3H, m), 7.63-7.61(2H, m), 7.51-7.48(2
 H, m), 7.40-7.38(3H, m), 7.31-7.29(4H, m), 7.21-7.11(5H, m), 6.88(2H, m), 6.47(
 1H, s), 6.08(1H, s), 5.93(1H, m), 5.21-5.19(1H, m), 5.13(1H, m), 4.78(1H, m), 4.6
 6-4.59(1H, m), 4.53-4.51(1H, m), 4.42-4.39(1H, m), 4.33-4.31(1H, m), 4.19-4.1
 1(6H, m), 4.10-3.86(4H, m), 3.82(3H, s), 3.76(3H, s), 3.73-3.71(3H, m), 3.56-3.
 51(7H, m), 3.32-3.29(2H, m), 2.73-2.69(1H, m), 2.40(1H, m), 2.29-2.27(3H, m), 2.
 06-2.04(4H, m), 1.73-1.70(2H, m), 1.25(2H, m), 0.96-0.93(6H, m), 0.66(4H, m).

MS(APCI, ESI)⁺m/z: 1378(M+H)⁺.

[0584] 工程13: グリシル-ル-ゾリル-N- {4- [({ [(11a' S) -11
 ' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- { [(11aS) -7-メトキシ-2
 - (4-メトキシフエニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-チトラヒドロ-1
 H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} フロボ
 キシ) -5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロ

パンー1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—ロイシンアミド

上記工程 12 にて得られた化合物 (0.0520g, 0.0377 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (2mL) 溶液に 1, 8-ジアザビスクロ [5. 4. 0]-7-ウンデセン (67 μ L, 0.0453mmol) を加え、室温で 1 時間撹拌した。減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : CMW=100:0(v/v), $\sim$ 0:100(v/v)] にて精製を行ない、目的物 (0.0420g, 92%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 8.64(1 H, s), 7.74(1 H, m), 7.66-7.64(1 H, m), 7.50(1 H, s), 7.45(1 H, s), 7.33-7.30(3H, m), 7.24-7.21(2H, m), 7.18-7.16(3H, m), 6.89(2H, m), 6.51(1 H, s), 6.15(1 H, s), 5.89(1 H, m), 5.27(1 H, m), 4.82-4.78(1 H, m), 4.74(1 H, m), 4.56-4.54(1 H, m), 4.49-4.47(1 H, m), 4.23-4.20(3H, m), 4.13-4.10(3H, m), 3.96-3.92(1 H, m), 3.90(3H, s), 3.83(3H, s), 3.76(3H, s), 3.72(2H, m), 3.62-3.56(5H, m), 3.40-3.36(1 H, m), 3.31(1 H, m), 3.04(1 H, m), 2.90-2.86(1 H, m), 2.75-2.71(1 H, m), 2.42-2.39(1 H, m), 2.36(2H, s), 2.29-2.27(3H, m), 2.07-2.05(3H, m), 1.97-1.95(1 H, m), 1.75-1.72(2H, m), 0.94(6H, m), 0.69(4H, m).

MS(APCI, ESI)m/z : 1156(M+H)⁺.

[0585] 工程 14 : N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] グリシルグリシル—L—プロリル—N-{4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル} オキシ} プロボキシ)-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ- Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン]-8-イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—ロイシンアミド

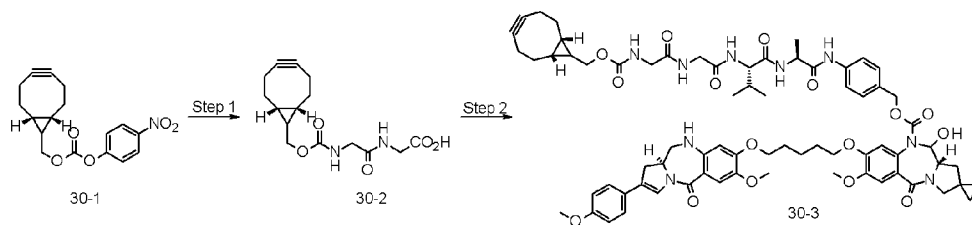
上記工程 13 にて得られた化合物 (0.0400g, 0.0346 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (1mL) 溶液に 1-[[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] オキシ} プロリジン-2, 5-ジオン (0.

0.140g, 0.0346mmol, Click Chemistry Tools) とジイソプロピルアミン (0.0240mL, 0.138mmol) を加え、室温で18時間撹拌した。反応液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 100 : 0(v/v) , ~ 90 : 10(v/v)] にて精製を行ない、目的物 (0.0230g, 46%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1443 (M+H) +.

[0586] 実施例 30 : 薬物リンカー 28

[化 154]



工程 1 : N- { [(1R, 8S) - ビシクロ [6. 1. 0] ノン-4-イン-9-イルメトキシ] カルボニル } グリシルグリシン

出発物質 30-1 (0.215g, 0.682mmol, Chemistry—A European Journal 2016, 22, 639) の N, N-ジメチルホルムアミド (4mL) 溶液に N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.119mL, 0.682mmol)、グリシル-グリシン (0.0900g, 0.682mmol)、及び水 (2mL) を加え、室温で一晩撹拌した。反応液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : CMW=100 : 0(v/v) , ~ 0 : 100(v/v)] にて精製を行い、目的物 (0.205g, 98%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 309(M+H) +.

[0587] 工程 2 : N- { [(1R, 8S) - ビシクロ [6. 1. 0] ノン-4-イン-9-イルメトキシ] カルボニル } グリシルグリシル-L-バリル-N- {4- [({ [(11a', S) - 11' - ヒドロキシ-7' - メトキシ-8' - [(5- { [(11aS) - 7'-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ } ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-1H, 11a' -ジヒドロ-1' H

スピロシクロピリゾジア
 ゼピン (5' H) -イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}
 -L-アラニンアミド

上記工程1にて得られた化合物 mmo 実施例3工程
 13と同様に反応させ、目的物 (0.0420g, 60%) を得た。

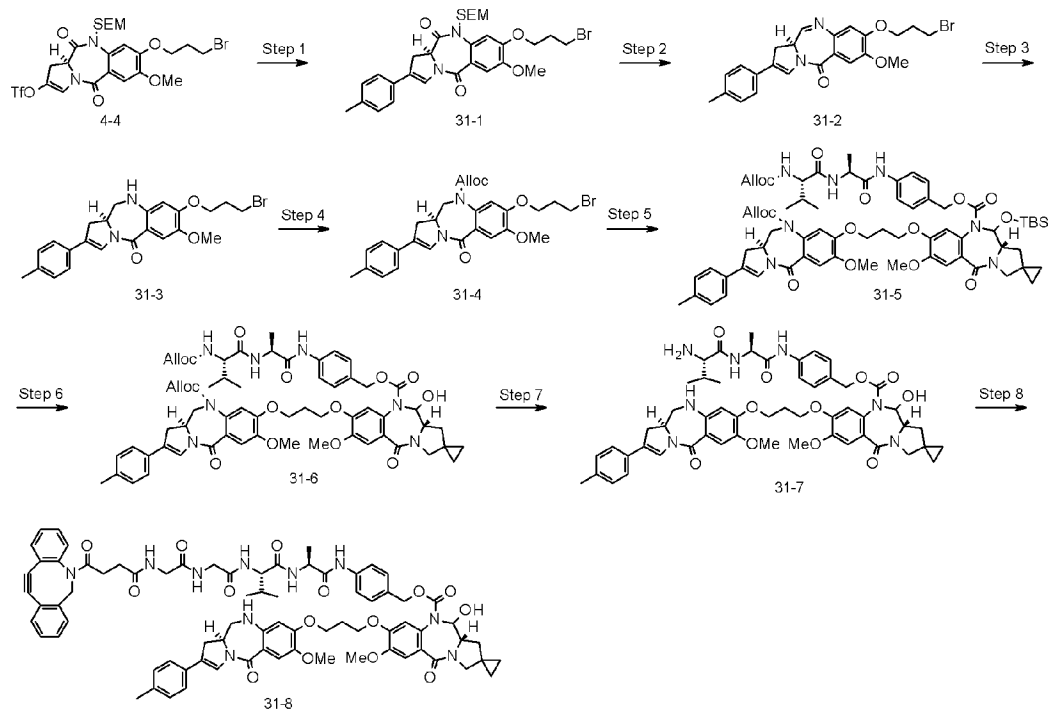
1

(3H, m), 3.78-3.76(9H, m), 3.66(3H, s), 3.60(2H, m), 3.55-3.52(2H, m), 3.45-3.38(2H, m), 3.26-3.23(1H, m), 3.14(1H, m), 2.77-2.74(1H, m), 2.35-2.33(1H, m), 2.20-2.11(6H, m), 1.99-1.96(1H, m), 1.81-1.78(4H, m), 1.56-1.54(5H, m), 1.29-1.26(4H, m), 0.87-0.82(9H, m), 0.67-0.62(4H, m).

MS(APCI, ESI) m/z : 1320 (M+H)⁺.

実施例31：薬物リンカー29

[化155]



工程 1 : 化合物 31-1

実施例 4 工程 4 にて得られた化合物 (1. 00g, 1. 52mmol) と 4-メチルフェニルボロン酸 (0. 309g, 2. 27mmol) を実施例 3 工程 6 と同様に反応させ、目的物 (0. 653g, 72%) を得た。

[0589] 工程 2 : 化合物 31-2

上記工程 1 にて得られた化合物 (0. 653g, 1. 09mmol) を、実施例 3 工程 7 と同様に反応させ、目的物 (0. 377g, 76%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 457[⁸¹Br, (M+H)⁺], 455[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0590] 工程 3 : 化合物 31-3

上記工程 2 にて得られた化合物 (0. 377g, 0. 828mmol) を、実施例 3 工程 8 と同様に反応させ、目的物 (0. 311g, 82%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 459[⁸¹Br, (M+H)⁺], 457[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0591] 工程 4 : 化合物 31-4

上記工程 3 にて得られた化合物 (0. 311g, 0. 68mmol) を、実施例 3 工程 9 と同様に反応させ、目的物 (0. 320g, 87%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 543[⁸¹Br, (M+H)⁺], 541[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

工程 5 : 化合物 31-5
上記工程 4 にて得られた化合物 (0. 0737g, 0. 136mmol) を、実施例 3 工程 10 と同様に反応させ、目的物 (0. 145g, 92%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1272 (M+H)⁺.

[0592] 工程 6 : 化合物 31-6

上記工程 5 にて得られた化合物 (0. 145g, 0. 114mmol) を、実施例 3 工程 11 と同様に反応させ、目的物 (0. 122g, 93%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1158 (M+H)⁺.

[0593] 工程 7 : 化合物 31-7

上記工程 6 にて得られた化合物 (0. 122g, 0. 114mmol) を、実施例 3 工程 12 と同様に反応させ、目的物 (0. 0598g, 53%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 990 (M+H)⁺.

[0594] 工程 8 : N-[4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)

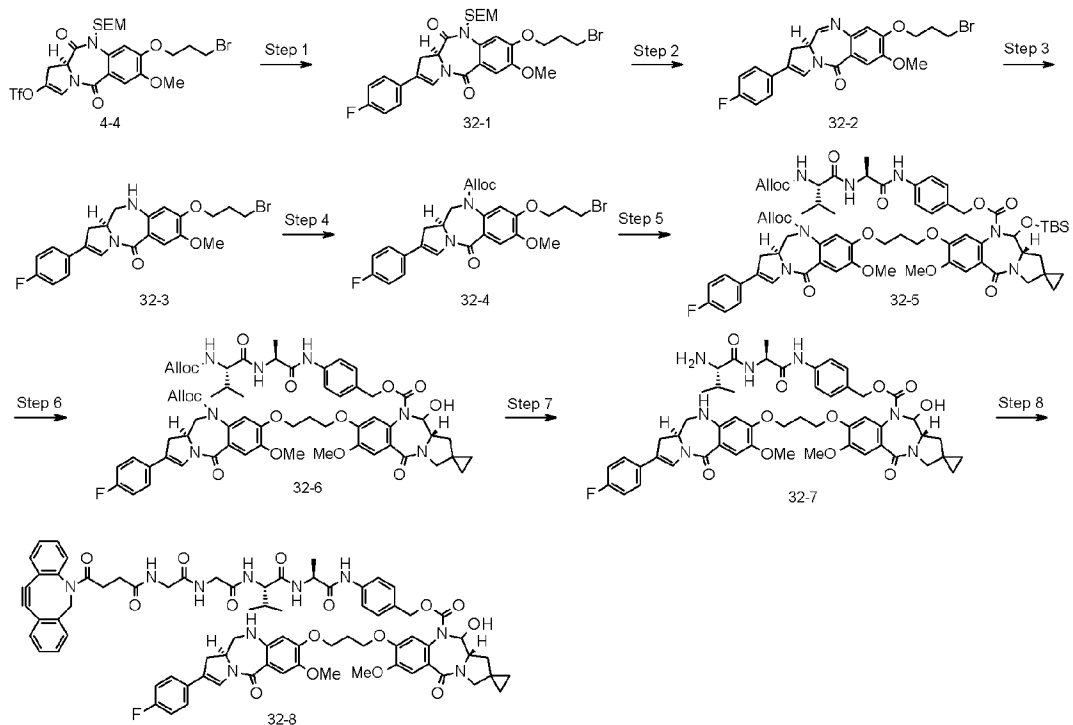
—イル) — 4—オキソプタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N— {4—
 [({ [(11a, S) - 11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' — (3— { [(11aS) — 7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) —5— オキソ— 5, 10, 11
 , 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—
 —イル] オキシ} プロボキシ) —5' —オキソ—11' , 11a' —ジヒドロ—1'
 H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジ
 アゼピン] —10' (5'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

上記工程7にて得られた化合物 (0. 0300g, 0. 0304mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0. 0184g, 44%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1391 (M+ H) +.

[0595] 実施例32 : 薬物リンカー30

[化156]



工程1 : 化合物32-1

実施例4工程4にて得られた化合物 (1. 00g, 1. 52mmol) と4—フルオロフェニルボロン酸 (0. 318g, 2. 27mmol) を実施例3工程6と同様に反応させ、

目的物 (0.623g, 68%) を得た。

[0596] 工程2 : 化合物 32-2

上記工程1にて得られた化合物 (0.623g, 1.03mmol) を、実施例3工程7と同様に反応させ、目的物 (0.244g, 52%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 461 [^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 459 [^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0597] 工程3 : 化合物 32-3

上記工程2にて得られた化合物 (0.244g, 0.531mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させ、目的物 (0.144g, 59%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 463 [^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 461 [^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0598] 工程4 : 化合物 32-4

上記工程3にて得られた化合物 (0.144g, 0.295mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (0.139g, 82%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 547 [^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 545 [^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0599] 工程5 : 化合物 32-5

上記工程4にて得られた化合物 (0.0742g, 0.136mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.138g, 88%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1284 (M+H) $^{+}$.

[0600] 工程6 : 化合物 32-6

上記工程5にて得られた化合物 (0.138g, 0.108mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.109g, 87%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1170 (M+H) $^{+}$.

[0601] 工程7 : 化合物 32-7

上記工程6にて得られた化合物 (0.109g, 0.101mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.0613g, 61%) を得た。 MS(APCI, ESI)m/z : 1002(M+H) $^{+}$.

[0602] 工程8 : N-[4-((11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-

イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-

[(11a, S)-8'-(3-[(11aS)-2-(4-フルオロフェニル

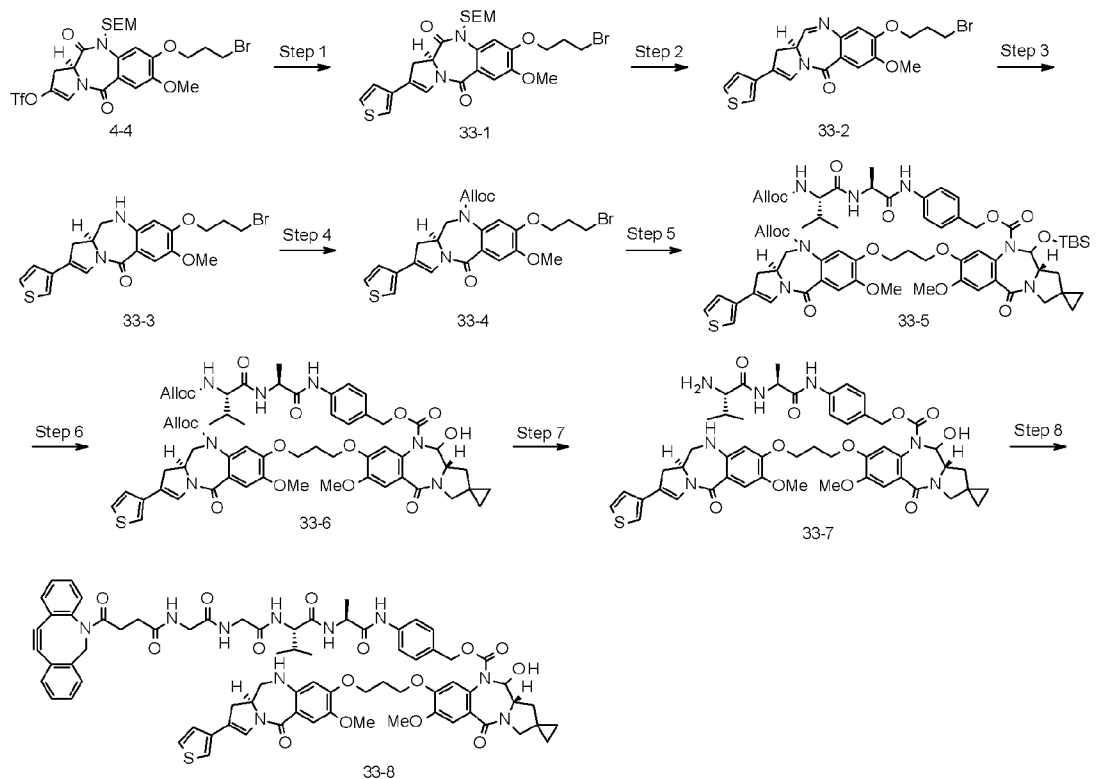
) _ 7-メトキシ-5_オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ
 [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8_イル}オキシ}プロボキシ)-1
 Γ-ヒドロキシ-7'-メトキシ-5'-オキソ-1Γ, 11a'-ジヒドロ-1
 , H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c] [1, 4] ベンゾ
 ジアゼピン]-10' (5' H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニ
 ル}-L-アラニンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0.0300g, 0.0333mmol) を、実施例3工程
 13と同様に反応させ、目的物 (0.0191g, 45%) を得た。

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

[0603] 実施例33 :薬物リンカー31

[化157]



工程1 :化合物 33-1

実施例4工程4にて得られた化合物 (1.00g, 1.52mmol) とチオフエン-3
 -ボロン酸 (0.582g, 4.55mmol) を用いて、実施例3工程6と同様に反応さ
 せ、目的物 (0.611g, 68%) を得た。

工程Z: 化合物33-2

上書き工程1に得られた化合物 (0.611g, 1.03 mmol) を用いて、実施例3工程Zと同様に反応させ、目録 (0.39g, 86%) を得た。

$^1\text{H}/\text{Z}: 4.49 [\text{s}] \text{B} \text{C} (\% \text{I} + \text{H})^+], 4.47 [\text{s}] \text{B} \text{C} (\% \text{H})^+]$

実施例3: 化合物33-3

上書き工程2に得られた化合物 (0.394g, 0.88 mmol) を用いて、実施例3工程Zと同様に反応させ、目録 (0.341g, 86%) を得た。

$^1\text{H}/\text{S}(\text{VpCl}), \text{E} [\text{si}] \text{m} / \text{Z}: 4.51 [\text{s}] \text{B} \text{C} (\% \text{I} + \text{H})^+], 4.49 [\text{s}] \text{B} \text{C} (\text{M} + \text{H})^+]$

実施例4: 化合物33-4

上書き工程4に得られた化合物 (0.341g, 0.759 mmol) を用いて、実施例3工程Zと同様に反応させ、目録 (0.368g, 91%) を得た。

$^1\text{H}/\text{S}(\text{VpCl}), \text{E} [\text{si}/\text{Z}: 5.35 [\text{s}] \text{B} \text{C} (\% \text{I} + \text{H})^+], 5.33 [\text{s}] \text{B} \text{C} (\% \text{H})^+]$

実施例5: 化合物33-5

上書き工程5に得られた化合物 (0.125g, 0.092 mmol) を用いて、実施例3工程Zと同様に反応させ、目録 (0.125g, 80%) を得た。

$^1\text{H}/\text{S}(\text{Vp}), \text{E} [\text{si}] \text{m} / \text{Z}: 1.260 (\% \text{I} + \text{H})^+]$

実施例6: 化合物33-6

上書き工程6に得られた化合物 (0.109g, 0.0951 mmol) を用いて、実施例3工程Zと同様に反応させ、目録 (0.109g, 96%) を得た。

$^1\text{H}/\text{S}(\text{Vp}), \text{E} [\text{si}] \text{m} / \text{Z}: 1.716 (\% \text{I} + \text{H})^+]$

実施例7: 化合物33-7

上書き工程7に得られた化合物 (0.109g, 0.0951 mmol) を用いて、実施例3工程Zと同様に反応させ、目録 (0.0723g, 8%) を得た。

$^1\text{H} \text{NMR}(\text{CDCl}_3)$ 6:9.1-9.04 (1H, m), 7.89-7.84 (1H, m), 7.47-7.42 (4H, m), 7.27-7.23 (3H, m), 7.1, 6.9, 6.8, 6.7, 6.6, 6.5, 6.4, 6.3, 6.2, 6.1, 6.0, 5.9, 5.8, 5.7, 5.6, 5.5, 5.4, 5.3, 5.2, 5.1, 5.0, 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1, 4.0, 3.9, 3.8, 3.7, 3.6, 3.5, 3.4, 3.3, 3.2, 3.1, 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 2.6, 2.5, 2.4, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.0 (1H, m), 2.38-2.29 (2H, m), 2.21-2.16 (2H, m), 1.12-1.09 (1H, m), 1.48-1.38 (3H, m), 86(3H, s), 3.75-3.69 (4H, m), 3.47-3.37 (4H, m), 3.34-3.29 (3H, m), 2.72-2.68 (1H, m), 5.86-6.84 (1H, m), 6.6-6.66 (1H, m), 4.66-4.71 (3H, m), 4.23-3.95 (5H, m), 3.81-3.71 (1H, s), 7.2-7.08 (2H, m), 6.94-6.96 (1H, m), 6.71-6.74 (1H, m), 6.08-6.04 (1H, m)

0.96-0.95(3H, m), 0.80-0.61(7H, m).

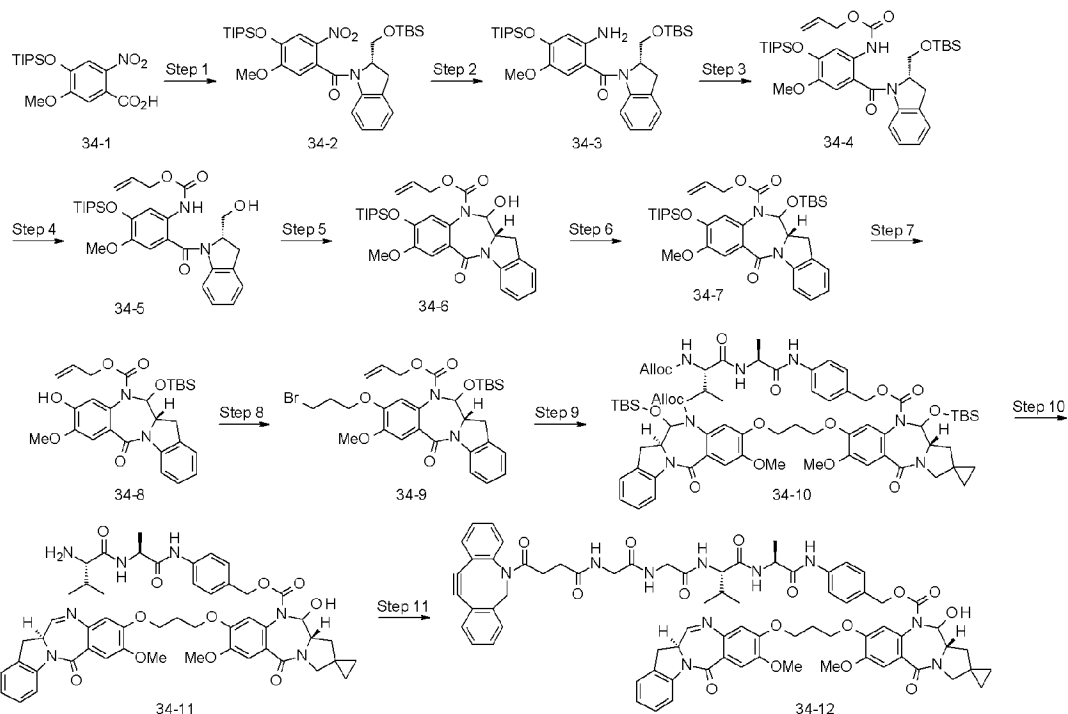
[061 0] 工程8: N-[4-(11,12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソプタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-((3-((11a,S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-((3-((11a,S)-7'-メトキシ-5-オキソ-2-(チオフエン-3-イル)-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル)オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-11',11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル)カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程7にて得られた化合物 (0.0300g, 0.0307mmol) を用いて、実施3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.0101g, 24%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z :1379 (M+H)+.

[061 1] 実施例34:薬物リンカー32

[化158]



工程1:化合物34-2

mm 1 在实施例1工程7と同

様 (c) 応、目的物 (2.32g, 7%、)、

[0615] 工程5：化合物34-6

上記工程4にて得られた化合物 (2.32g, 4.18mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (1.68g, 73%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 553 (M+H)⁺

0616] 工程6：化合物34-7

上記工程5にて得られた化合物 (1.68g, 3.04mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させ、目的物 (2.32g, 定量的) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.16 (1H, m), 7.28-7.20 (3H, m), 7.09-7.07 (1H, m), 6.70 (1H, s), 5.80-5.76 (2H, m), 5.14-5.12 (2H, m), 4.60 (1H, m), 4.37 (1H, m), 4.01-3.99 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.45-3.41 (1H, m), 2.99-2.95 (1H, m), 1.28-1.23 (3H, m), 1.10-1.07 (18H, m), 0.92 (9H, s), 0.26 (3H, s), 0.19 (3H, s).

] 工程7：化合物34-8

上記工程6にて得られた化合物 (2.32g, 3.48mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的物 (1.42g, 80%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 511 (M+H)⁺

61] 工程8：化合物34-9

上記工程7にて得られた化合物 (0.720g, 1.41mmol) を、実施例4工程1と同様に反応させ、目的物 (0.580g, 65%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 633 [⁸¹Br, (M+H)⁺], 631 [⁷⁹Br, (M+H)⁺].

] 工程9：化合物34-10

上記工程8にて得られた化合物 (0.235g, 0.371mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.347g, 83%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1359 (M+H)⁺

] 工程10：化合物34-11

上記工程9にて得られた化合物 (0.347g, 0.255mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、シリル脱保護体 (0.265g, 92%) を得た。シリル脱保護 (. 265g, 231 l) を実施例1工程2と同 (c) 応、

0.86g, 39%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 944 (M+H)⁺

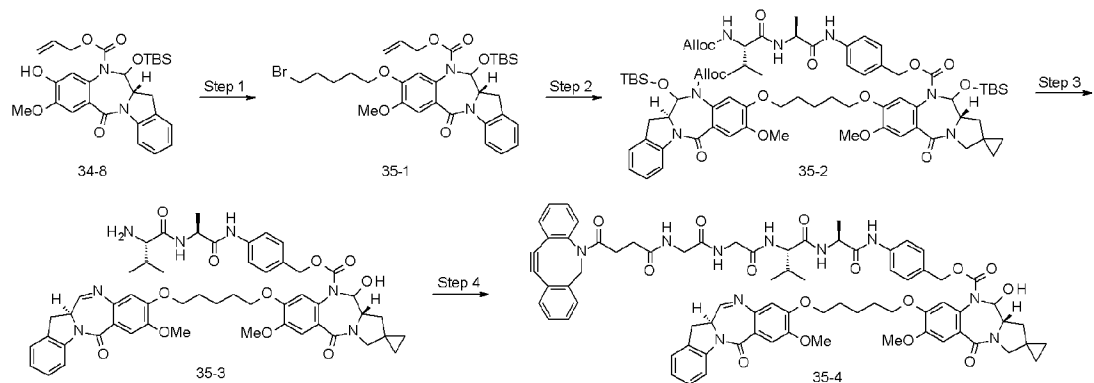
[0621] 工程 11 : N-[4-(11, 12-ジヒドロベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[({(11a, S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-{(5aS)-10-メトキシ-12-オキソ-5a, 12-ジヒドロ-5H-インドロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-9-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-1H, 11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程 10にて得られた化合物 (0.0860g, 0.0911mmol) を、実施例 3 工程 13 と同様に反応させ、目的物 (0.0800g, 65%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1345 (M+H)⁺

[0622] 実施例 35 : 薬物リンカー 33

[化 159]



工程 1 : 化合物 35-1

実施例 34 工程 7 にて得られた化合物 (0.700g, 1.37mmol) を、実施例 3 工程 2 と同様に反応させ、目的物 (0.790g, 87%) を得た。

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

[0623] 工程 2 : 化合物 35-2

上記工程 1 にて得られた化合物 (0.245g, 0.371mmol) を、実施例 3 工程 10

と同様に反応させ、目的物 (0.368g, 86%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1387 ($M+H$) +

[0624] 工程3 : 化合物 35-3

上記工程2にて得られた化合物 (0.368g, 0.265mmol) を、実施例3工程11, 12と同様に反応させ、目的物 (0.180g, 81%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 972 ($M+H$) +

[0625] 工程4 : N-[4-((11, 12-ジヒドロベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-

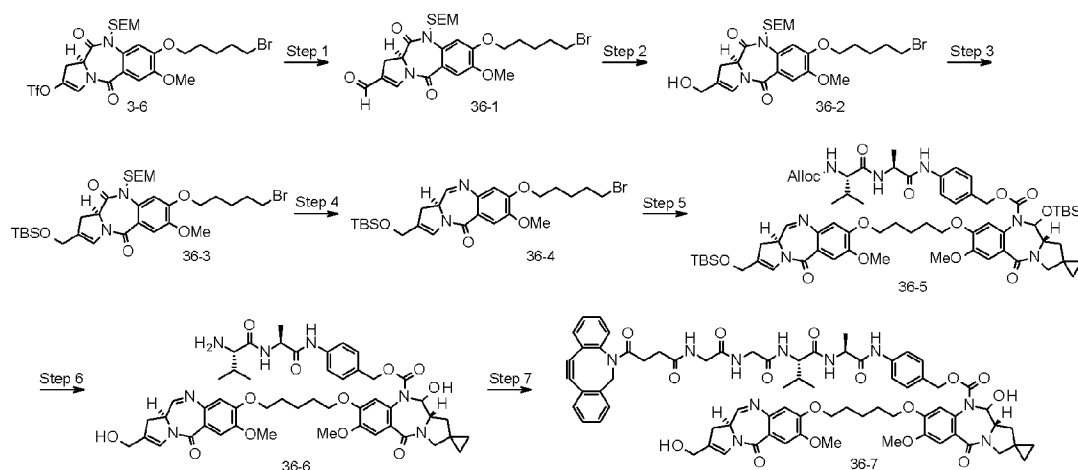
イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-
[({[(11a, S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[5-
(5aS)-10-メトキシ-12-オキソ-5a, 12-ジヒドロ-5H-インドロ[
2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-9-イル]オキシ}ペンチル)オキシ
]-5'-オキソ-1 Γ , 11a'-ジヒドロ- Γ H-スピロ[シクロプロパン
-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-
イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル]-L-アラニンアミド

上記工程3にて得られた化合物 (0.0700g, 0.0720mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.0440g, 44%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1373 ($M+H$) +

[0626] 実施例36 : 薬物リンカー34

[化160]



工程1 : (11aS)-8-[(5-プロモペンチル)オキシ]-7-メトキシ-5,

11-ジオキソ-10- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル } -5, 10, 11, 11a-チトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-2-カルバルデヒド

実施例3工程5にて得られた化合物 (3.54g, 5.15mmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (52mL) に溶解し、N-ホルミルサルサツカリン (5.44g, 25.7mmol)、酢酸パラジウム (0.0578g, 0.257mmol)、1, 4-ビス (ジフェニルホスフィン) グタシオン (0.154g, 0.360mmol)、炭酸ナトリウム (2.73g, 25.7mmol)、トリエチルシラン (1.20g, 10.3mmol) を加え、室温にて19時間撹拌した。反応溶液に水を加え、反応溶液を酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサソ : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) ~ 40 : 60 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.760g, 26%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 9.74(1H, s), 7.79(1H, s), 7.32(1H, s), 7.24(1H, s), 5.54(1H, m), 4.76-4.69(2H, m), 4.07-4.05(2H, m), 3.93(3H, s), 3.83-3.65(3H, m), 3.45(2H, m), 3.02-2.98(1H, m), 1.95-1.91(4H, m), 1.69-1.58(2H, m), 1.02-0.92(2H, m), 0.6-0.03(9H, m).

2^o 工程2 : (11a) -8- [(5-プロモペンチル) オキシ] -2- (ヒドロキシメチル) -7-メトキシ-10- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル } -1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5, 11 (10H, 11aH) -ジオン

上記工程1にて得られた化合物 (0.760g, 1.34mmol) をジクロロメタン (14mL) に溶解し、水素化ホウ素ナトリウム (0.101g, 2.68mmol) を -78℃ で加えた後、室温まで昇温した。反応溶液に1規定塩酸を加え、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサソ : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) ~ 40 : 60 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.432g, 5.2%) を得た。

同 仁 心 的 得 7

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.83(1 H, m), 7.51(1 H, s), 6.92(1 H, m), 6.79(1 H, s), 4.32-4.30(3H, m), 4.12-4.04(2H, m), 3.93(3H, s), 3.86-3.84(1 H, m), 3.46-3.39(2H, m), 3.26-3.23(1 H, m), 3.07-3.03(1 H, m), 1.97-1.85(4H, m), 1.68-1.63(2H, m), 0.92(9H, s), 0.09(6H, s).

MS(APCI, ESI)m/z : 539[⁸¹Br, (M+H)⁺], 537[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0630] 工程5: N-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[({ [(11a, S)-11'-tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-8'-(5-{ [(11aS)-2-({ [tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}メチル)-7-メトキシ-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-7'-メトキシ-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程4にて得られた化合物 (0.251g, 0.467mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.300g, 51%) を得た。

[0631] 工程6: L-バリル-N-{4-[({ [(11a, S)-11'-ヒドロキシ-8'-(5-{ [(11aS)-2-(ヒドロキシメチル)-7-メトキシ-5-オキソ-5, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-7'-メトキシ-5'-オキソ-1H, 11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'-(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (0.300g, 0.237mmol) を、実施例33工程1、12と同様に反応させ、目的物 (0.0540g, 53%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 952 (M+H)⁺

[0632] 工程7: N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-

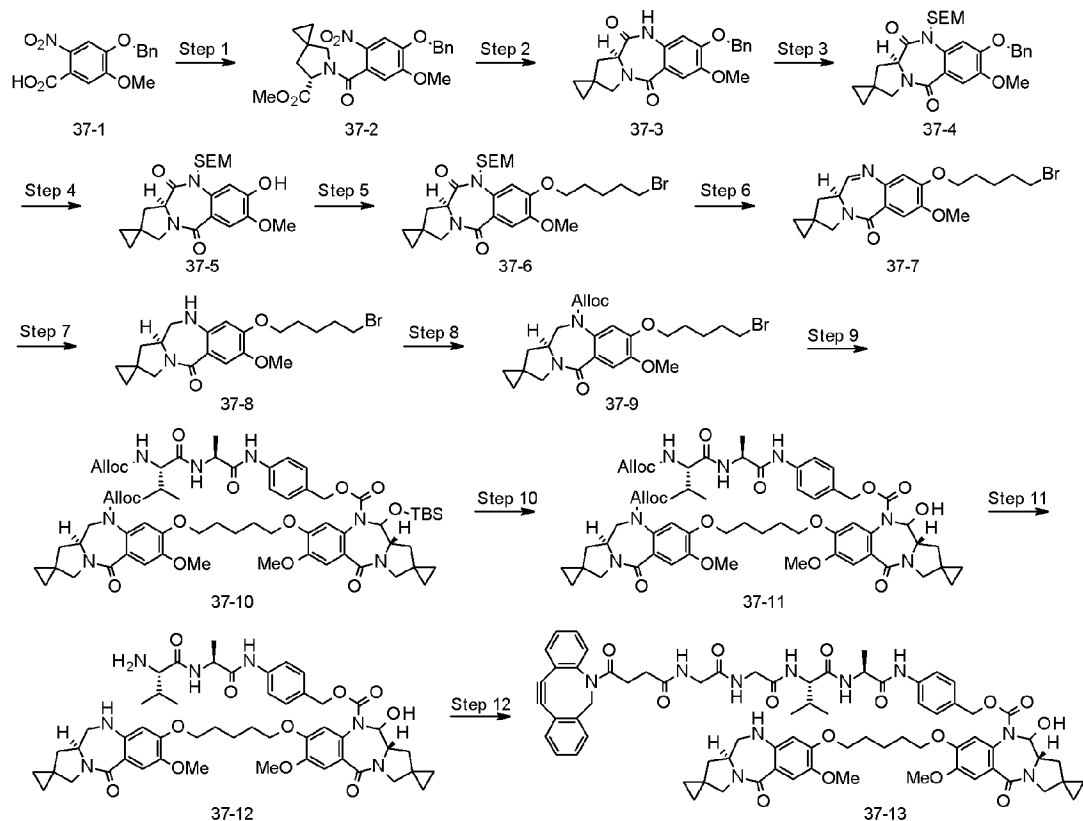
[({ [(11a, S) - 11' - ヒドロキシ-8' - [(5- { [(11aS) _2_ (ヒドロキシメチル) _7-メトキシ-5_ オキソ _5, 11a-ジヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン _8_ イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - , -メトキシ-5' -オキソ-1H , 11a' -ジヒドロ _1_ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

上記工程6にて得られた化合物 (0.0500mg, 0.0525mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0.0340mg, 48%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z :1351 (M-H) -

[0633] 実施例37 : 薬物リンカー35

[化161]



工程1 : メチル (6S) -5- [4- (ベンジルオキシ) _5-メトキシ-2_ ニトロベンゾイル] _5_ アザスピロ [2. 4] ヘプタン-6_ カルボキシレート

4- (ベンジルオキシ) _5-メトキシ_ 2-ニトロ安息香酸 (6.07g, 20.

0mmol, Tetrahedron 1995, 51, 5617)、N,N-ジメチルホルムアミド (1.08mL, 13.9mmol) のジクロロメタン (100mL) 溶液に、氷冷下にて塩化オキサリル (3.43mL, 40.0mmol) を5分間かけて滴下した。室温にて反応溶液を5時間攪拌した後、減圧留去し、得られた残渣をジクロロメタン (20mL) に溶解させ、減圧留去した。この操作を3回繰り返した後に、残渣をジクロロメタン (5mL) に懸濁させ、これに過剰のジエチルエーテルとヘキサンを加え、ろ過し、減圧下に乾燥させることにより粗酸クロリドを得た。得られた酸クロリドをジクロロメタンに溶解させ、 -40°C (ドライアイス-アセトニトリル浴) に冷却し、メチル (6S) β -アザスピロ [2.4] ヘプタン β -カルボキシレート塩酸塩 (4.22g, 22.0mmol, Tetrahedron Letters 2012, 53, 3847)、トリエチルアミン (3.36mL, 24.2mmol) を徐々に加えた。反応混合物を一晩かけて室温にまで昇温した。反応混合物に1規定塩酸を加え、反応混合物をジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0~50 : 50] にて精製し、目的物 (6.55g, 80%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 441 ($M+H$)⁺

[0634] 工程2 : (11a' S) β - (ベンジルオキシ) -7'-メトキシ- β -H-スピロ [シクロプロパン-1,2'-ピロロ [2,1-c] [1,4] ベンゾジアゼピン] -5', 1 β (10' H, 11a' H) -ジオン

上記工程1にて得られた化合物 (6.55g, 16.0mmol) のエタノール (150mL)、THF (150mL) 溶液に窒素雰囲気下、ラネーニッケル (7.00g) を加えた。反応混合物にヒドラジーン水和物 (7mL) を加え、 50°C まで徐々に昇温した。 50°C にて2時間攪拌した後にラネーニッケル (3.00g)、ヒドラジーン水和物 (3mL) を加え、1時間攪拌した。反応混合物にTHF (100mL) を加えて、セライトろ過した。減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0(v/v) ~ 25 : 75(v/v)] にて精製

し、目的物 (4.42g, 73%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.45-7.44 (2H, m), 7.37-7.32 (4H, m), 7.28 (1H, s), 5.48-5.46 (1

6.44 (1, 5.16 (2, 4.16-4.10 (1, 3.37 (1H, m), 2.45-2.43 (1H, m), 2.24-2.21 (1H, m), 0.83-0.61 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 379 (M+H)⁺

[0635] 工程3: (11a' S) -8' - (ベンジルオキシ) -7' -メトキシ-10' - {

2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -1' H-スピロ [シクロプロパ
ン-1, 2' -スピロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -5', 11' (1
0' H, 11a' H) -ジオン

上記工程2にて得られた化合物 (10.0g, 26.4mmol) の THF (150mL) 溶液

に -40°C にて、2.6mol/L の ノルマルブチルリチウムヘキサソ溶液

(12.0mL, 31.8mmol) をゆっくりと滴下した。反応溶液を -40°C にて15分

間攪拌した後、2- (クロロメトキシ) エチルトリメチルシリン (5.57mL, 31

.7mmol) をゆっくりと滴下した。反応溶液を室温にて3時間攪拌した後、水

を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水

硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧留去して得られた残渣を、シリカゲルカウ

ムクロマトグラフィー [ヘキサソ: 酢酸エチル = 100:0 (v/v) ~ 30:70 (v/v)]

にて精製し、目的物 (11.8g, 88%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.45-7.44 (2H, m), 7.37-7.32 (4H, m), 7.28 (1H, s), 5.48-5.46 (1
H, m), 5.21 (2H, s), 4.50-4.48 (1H, m), 4.22-4.20 (1H, m), 3.95 (3H, s), 3.73-3.70 (2H, m), 3.62-3.60 (1H, m), 3.41-3.38 (1H, m), 2.45-2.43 (1H, m), 2.23-2.20 (1H, m), 0.98-0.96 (2H, m), 0.83-0.68 (4H, m), 0.04 (9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 509 (M+H)⁺

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

上記 化合物 1、エタノール (100mL) 溶液に、窒素雰囲気下において5%のポリウレタン炭素触媒 (5

同 (c) の	の	45%)	得7
$^1\text{H-NMR}$	(δ : 7.81 (1H)		
		2	
		2(4	
		2	
	13-4.	5	
	2		
	7(		

[0639] エ %4: (11a' s) —8, — [(6-ジロ i ベンチル) キシ] —フ —ズトキ
 シー1', 10', 11', 11a' —ズトキ トロ s, H—スロロ [ベクロロポ
 シー1, 2' —ロロ [2, 1 -c] [1, 41] ベンゾジアゼレン] —6' —オン

上書き エ %6 □ 得 %レ化 毒物 (Z, 56g, 6. 08 ■ 10) を、実例工 %8マ
 同様に反, させ、目 %物 (I, 15g, 416%) をきマ。

H-N ■ (CD13ε) δ: 7.7-6.0 (1H s), 6.04 (1H s), 4.11-1.7 (1H, φ, 3.99 (2H, φ, 3.84 -
 3.84 (1H, φ, 3.86 (3H s), 3.73 (1H, φ, 3.68-3.53 (2H, φ, 3.47-3.42 (3H, m), 2.03
 ト 7.8 (6H, m), 1. 66-1.63 (2H, φ, 0. 0. 17-0. 66 (4H, φ, 1.

[061790] エ %8: フロフ_2_エソ—1—イル (11a' s) —8, — [(6-ジロ i ベンチ
 (1) オキシ i —フ —ズトキシ—5' —オキノ—11', 11a' —ジロ トロ i, H
 —スロロ [シクロロポ/《ベ i, 2' —ロロ [2, 1 -c] [1, 41] ベンゾジア
 ゼレンベ [-10', (6' H) -カルボキシレート

上書き エ %にエ得られ化 毒物 (I, 15g, 2. 72 ■ 1) を、実例工 %9マ
 同様に反, させ、目 %物 (1. 14B, 82%) を得た。

H-N ■ (CD13ε) δ: 7.23 (7H, s), 6.69 (7H, s), S. 79 (1H, s), S. 13-6. 10 (2H, m), 4. 68-
 4.66 (1H, m), 4.48-4.45 (2H, m), 4.01 (ZH, φ, 3.92 (3H s), 3.76 (1H, φ, 3.54-3.37
 (3H, φ, 2.39 (1H, m), 1. 66-1.90 (4H, m), 1. 68-1.61 (3H, φ, 0. 44 (1H, φ, 0. 76-0. 6

6(4H, m).

[0640] エ %9: N — [(フロフ_2_エソ—1—イル キシ) カルボニル —L -バニル
 —N — {4 — [({ (11a' s) —71' — { [tert—チル (ジメチル) シリ
 ル] オキシ} —7' —ズトキシ—8' — { — { (11a' s) —7' —ズトキ
 シ—5' —オキノ—10' — [(フロフ_2_エソ—1—イル キシ) カルボニル
] —6', 10', 11', 11a' —ズトキ トロ, H—スロロ [シクロロポ/《ベ
 1, 2' —ロロ [2, 1 -c] [1, 41] ベンゾジアゼレン] —8, —イル} オキ
 (>) ベンチル] オキシ} —6' —オキノ—11', 11a' —ジロ トロ i, H—ス
 ロロ [シクロロポ/《ベ i, 2' —ロロ [2, 1 -c] [1, 41] ベンゾジアゼレン
 シ] —10', (6' H) —イル] カルボニル} キシ) メチル] 2 エニル} —1 -

ト 9 ニ ペ ト キ

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

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

[0642] 工程10: N-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-L-バリル-N-{4-[(11a'-S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-{5'-[(11a'-S)-7'-メトキシ-5'-オキソ-10'-[(プロポ-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]-5', 10', 1Γ, 11a'-テトラヒドロ-Γ-H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-8'-イル}オキシ)ペンチル}オキシ]-5'-オキソ-1Γ, 11a'-ジヒドロ-Γ-H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (0.589g, 0.477mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.382g, 71%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.90(1H, s), 7.55(2H, m), 7.25-7.21(2H, m), 6.74(2H, m), 6.38(1H, s), 5.90-5.87(5H, m), 5.33-5.09(8H, m), 4.66-4.60(8H, m), 3.98-3.91(10H, m), 3.77-3.30(12H, m), 2.42-2.36(2H, m), 1.77-1.39(6H, m), 0.91-0.70(14H, m).

[0643] 工程11: L-バリル-N-{4-[(11a'-S)-1Γ-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-{5'-[(11a'-S)-7'-メトキシ-5'-オキソ-5', 10', 1Γ, 11a'-テトラヒドロ-1'-H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-8'-イル}オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'-H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'-H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

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

MS (APCI, ESI) m/z :952 (M+H) +

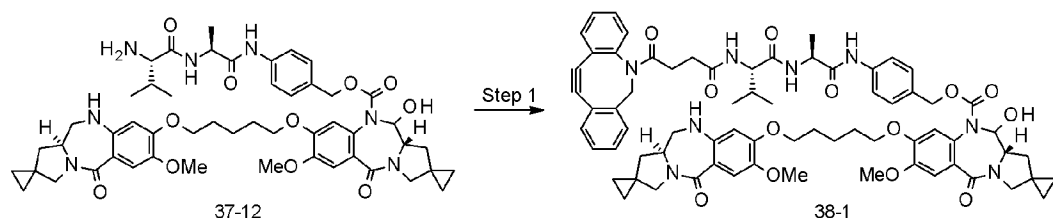
[0644] 工程 12 : N— [4- (11, 12—ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン—5 (6H)—イル) —4—オキソプタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N— {4— [({ [(11a, S) - 11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—8' — [(5— { [(11a', S) -7' —メトキシ—5' —オキソ—5' , 10' , 11' , 11a' —テトラヒドロ— Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —8' —イル] オキシ} ペンチル) オキシ] —5' —オキソ—1 Γ , 11a' —ジヒドロ— Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—アラニンアミド

上記工程 11にて得られた化合物 (0. 0560g, 0. 0588mmol) を、実施例 3 工程 13 と同様に反応させ、目的物 (0. 0500g, 63%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z :1354 (M+ H) +

[0645] 実施例 38 : 薬物 リンカー 36

[化 162]



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

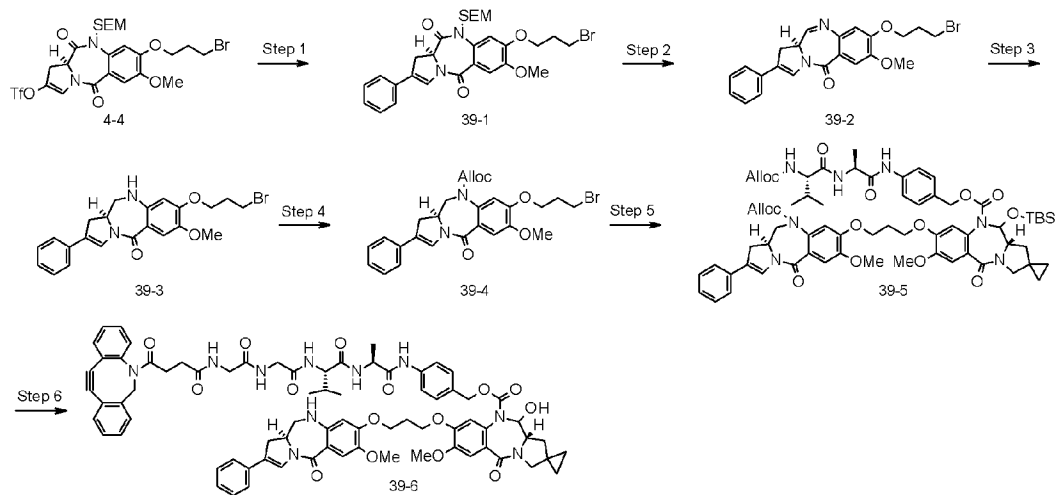
実施例 37 工程 11にて得られた化合物 (0. 041 0g, 0. 0430mmol) を、実施例

6工程1と同様に反応させ、目的物 (0.0210g, 39%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1240 (M+H)⁺

[0646] 実施例39 : 薬物リンカー37

[化163]



工程1 : 化合物39-1

実施例4工程4にて得られた化合物 (1.00g, 1.52mmol) とフェニルボロン酸 (0.370g, 3.03mmol) を用いて、実施例3工程6と同様に反応させ、目的物 (0.726g, 81%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 589[⁸¹Br, (M+H)⁺], 587[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0647] 工程2 : 化合物39-2

上記工程1にて得られた化合物 (0.726g, 1.24mmol) を、実施例3工程7と同様に反応させ、目的物 (0.344g, 63%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 443[⁸¹Br, (M+H)⁺], 441[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0648] 工程3 : 化合物39-3

上記工程2にて得られた化合物 (0.344g, 0.779mmol) を、実施例3工程8と同様に反応させ、目的物 (0.248g, 72%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 445[⁸¹Br, (M+H)⁺], 443[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0649] 工程4 : 化合物39-4

上記工程3にて得られた化合物 (0.248g, 0.559mmol) を、実施例3工程9

と同様に反応させ、目的物 (0. 267g, 90%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 529[^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 527[^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0650] 工程5 : 化合物 39-5

上記工程4にて得られた化合物 (0. 100g, 0. 190mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0. 201g, 85%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1255 (M+H) $^{+}$.

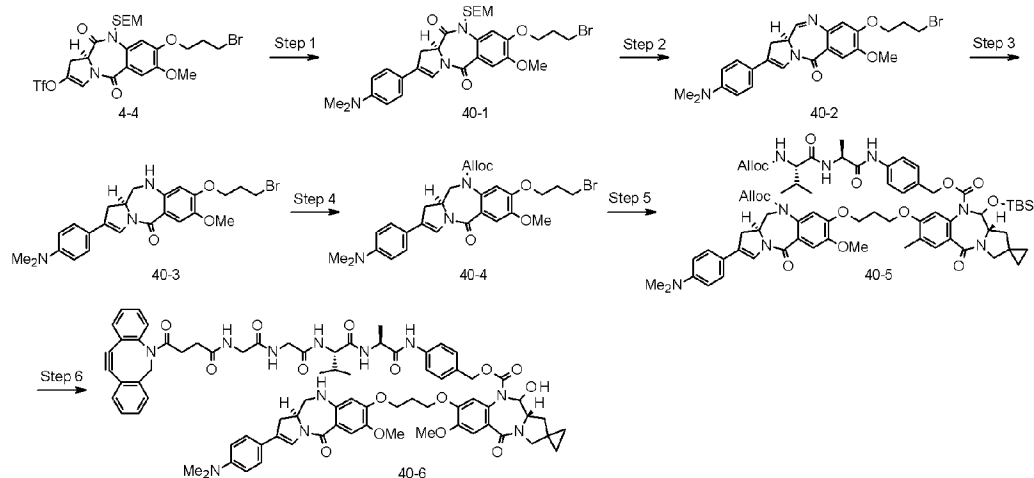
[0651] 工程6 : N-[4-((11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソプタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-L-[4-((3-((11a, S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-((11a, S)-7'-メトキシ-5'-オキソ-2'-フェニル-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル)オキシ)プロポキシ)-5'-オキソ-1H-11a'-ジヒドロ-1H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'-H)-イル]カルボニル)オキソ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド

上記工程5にて得られた化合物 (0. 201g, 0. 160mmol) を、実施例3工程11、12、13と同様に反応させ、目的物 (0. 080g, 36%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1372 (M+H) $^{+}$.

[0652] 実施例40 : 薬物リンカー38

[化164]



工程 1 : 化合物 40-1

実施例 4 工程 4 にて得られた化合物 (1. 48g, 2. 24mmol) と 4- (ジメチルアミノ) フェニルボロン酸 (0. 741 g, 4. 49mmol) を実施例 3 工程 6 と同様に反応させ、目的物 (0. 520g, 37%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 632[^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 630[^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0653] 工程 2 : 化合物 40-2

上記工程 1 にて得られた化合物 (0. 520g, 0. 825mmol) を、実施例 3 工程 7 と同様に反応させ、目的物 (0. 167g, 42%) を得た。

[0654] 工程 3 : 化合物 40-3

上記工程 2 にて得られた化合物 (0. 167g, 0. 345mmol) を、実施例 3 工程 8 と同様に反応させ、目的物 (0. 0650g, 39%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 488[^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 486[^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0655] 工程 4 : 化合物 40-4

上記工程 3 にて得られた化合物 (0. 0650g, 0. 134mmol) を、実施例 3 工程 9 と同様に反応させ、目的物 (0. 0690g, 90%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z : 572[^{81}Br , (M+H) $^{+}$], 570[^{79}Br , (M+H) $^{+}$].

[0656] 工程 5 : 化合物 40-5

上記工程 4 にて得られた化合物 (0. 0690g, 0. 121mmol) を、実施例 3 工程 10 と同様に反応させ、目的物 (0. 0660g, 42%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z : 1297 (M+H) $^{+}$.

[0657] 工程 6 : N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン—5 (6H)—イル) —4-オキソプタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N- {4- [({ [(11a, S) —8' - [3- ({ (11aS) —2- [4- (ジメチルアミノ) フェニル] —7-メトキシ—5-オキソ—5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル} オキシ) プロポキシ] —11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—5' —オキソ—11' , 11a' —ジヒドロ—Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H)—イル] カルボニル} オキシ) メ

チル] フェニル} -L-アラニンアミド

上記工程5にて得られた化合物

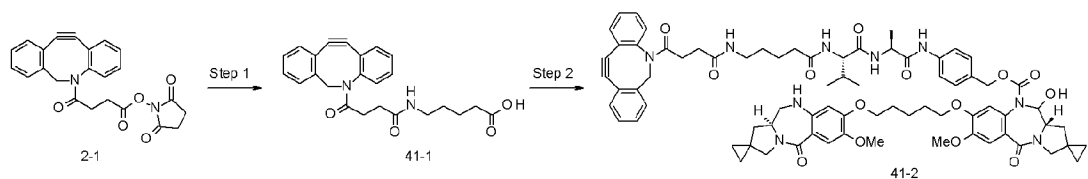
mmol)

実施例3工程

1、13と同様に反応させ、目的物 (0.0350g, 49%) を得た。

[実施 41 : 薬物リ カー

[化165]



工程1 : 5- { [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] アミノ} 吉草酸 N, N-ジメチルホルムアミド付加物

5-アミノ吉草酸 (0.436g, 3.72mmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (10mL) に溶解し、1- { [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] オキシ} ピロロジン-2, 5-ジオン (1.36g, 3.38mmol) 、トリエチルアミン (0.937mL, 6.76mmol) を室温にて加え、室温にて1.5時間攪拌した。反応溶液に1規定塩酸を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧留去し、得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム〜クロロホルム : メタノール : 水 = 7 : 3 : 1 分配有機層] にてし、的体として得た。

^1H NMR (CDCl₃) δ 7.8 (d, 2H), 7.5 (d, 2H), 7.2 (d, 2H), 7.0 (d, 2H), 6.8 (d, 2H), 6.5 (d, 2H), 6.2 (d, 2H), 6.0 (d, 2H), 5.8 (d, 2H), 5.5 (d, 2H), 5.2 (d, 2H), 5.0 (d, 2H), 4.8 (d, 2H), 4.5 (d, 2H), 4.2 (d, 2H), 4.0 (d, 2H), 3.8 (d, 2H), 3.5 (d, 2H), 3.2 (d, 2H), 3.0 (d, 2H), 2.8 (d, 2H), 2.5 (d, 2H), 2.2 (d, 2H), 2.0 (d, 2H), 1.8 (d, 2H), 1.5 (d, 2H), 1.2 (d, 2H), 1.0 (d, 2H), 0.8 (d, 2H), 0.5 (d, 2H), 0.2 (d, 2H), 0.0 (d, 2H).

), ^{13}C NMR (CDCl₃) δ 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0.

6-1 ^1H NMR (CDCl₃) δ 7.8 (d, 2H), 7.5 (d, 2H), 7.2 (d, 2H), 7.0 (d, 2H), 6.8 (d, 2H), 6.5 (d, 2H), 6.2 (d, 2H), 6.0 (d, 2H), 5.8 (d, 2H), 5.5 (d, 2H), 5.2 (d, 2H), 5.0 (d, 2H), 4.8 (d, 2H), 4.5 (d, 2H), 4.2 (d, 2H), 4.0 (d, 2H), 3.8 (d, 2H), 3.5 (d, 2H), 3.2 (d, 2H), 3.0 (d, 2H), 2.8 (d, 2H), 2.5 (d, 2H), 2.2 (d, 2H), 2.0 (d, 2H), 1.8 (d, 2H), 1.5 (d, 2H), 1.2 (d, 2H), 1.0 (d, 2H), 0.8 (d, 2H), 0.5 (d, 2H), 0.2 (d, 2H), 0.0 (d, 2H).

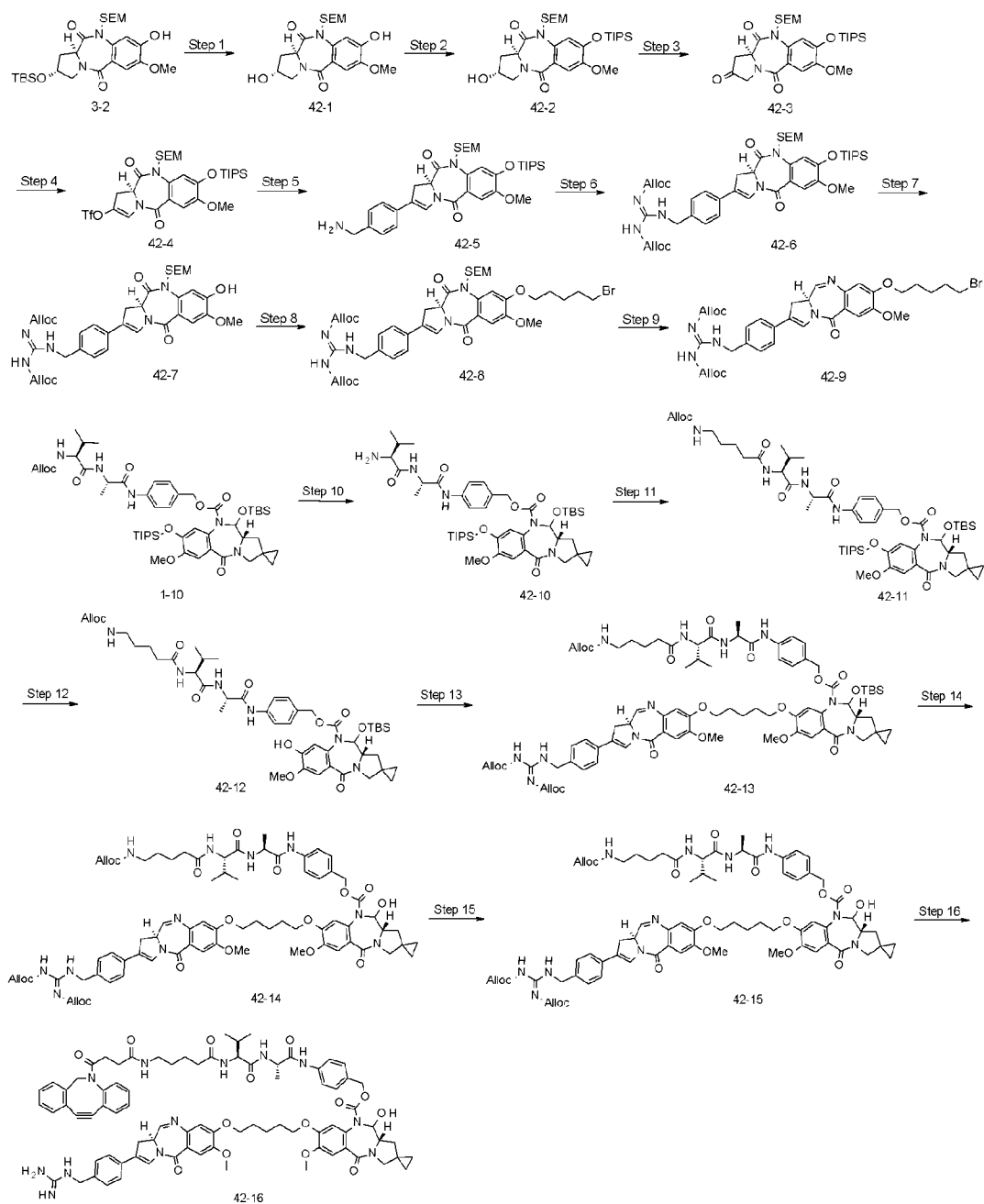
[0659] 工程2: N- (5- { [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソプタノイル] アミノ} ペンタノイル) -L-バリン_N- {4- [({ [(11a' S) - 11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(11a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5' , 10' , 11' , 11a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-1Γ , 11a' -ジヒドロ_Γ H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド

上記工程1にて得られた化合物 (0. 0176g, 0. 0368mmol) を、実施例3工程13と同様に反応させ、目的物 (0. 00880g, 18%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z :1339 (M+ H) +

[0660] 実施例42 :薬物 リンカー40

[化 166]



工程 1 :化合物 42-1

実施例 3 工程 1 で得られた化合物 (5.00g, 9.66mmol) を実施例 3 工程 3 と同様に反応させ目的物 (3.95g, 100%) を得た。MS(APCI, ESI) m/z : 409(M+H)⁺

[0661] 工程 2 :化合物 42-2

上記工程 1 で得られた化合物 (3.95g, 9.67mmol) を実施例 24 工程 2 と同様に反応させ目的物 (4.78g, 87%) を得た。

す。

す。

上記工程2にて得られた化合物 (4. 78g, 8. 43mmol) を、実施例3工程4と同様に反応させ、目的物 (2. 36g, 50%) を得た。MS(APCI, ESI)m/z: 563(M+H)⁺

[0663] 工程4: 化合物42-4

上記工程3にて得られた化合物 (1. 53g, 2. 72mmol) を実施例3工程5と同様に反応させ、目的化合物 (1. 27g, 69%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.31(2H, s), 7.15(1H, m), 5.52(1H, m), 4.65(1H, m), 4.57(1H, m), 3.95-3.89(1H, m), 3.87(3H, s), 3.75-3.58(2H, m), 3.18-3.14(1H, m), 1.33-1.25(3H, m), 1.10(18H, m), 1.00-0.96(2H, m), 0.03(9H, s)。

[0664] 工程5: 化合物42-5

上記工程4にて得られた化合物 (0. 255g, 0. 367mmol) と、4- (アミノメチル) フェニルボロソ酸 (0. 344g, 1. 84mmol) を実施例3工程6と同様に反応させ、目的物 (0. 148g, 62%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z: 652(M+H)⁺

[0665] 工程6: 化合物42-6

上記工程5で得られた化合物 (0. 142g, 0. 218mmol) とジプロポ-2-エノ-1-イル [(Z)- (メチルスルホニル) メチリジン] ビスカルバメ-ト (0. 079g, 0. 079mmol, W09920628) のジメチルホルムアミド (2. 2mL) の溶液に、トリエチルアミン (0. 090mL, 0. 653mmol) と塩化水銀 (II) (0. 083g, 0. 305mmol) を室温にて加えた。反応溶液を室温で30分間攪拌した後、反応溶液に酢酸エチルを加え希釈し、水銀塩をろ過により除去した。得られた有機層を0. 1規定のリソ酸緩衝液と飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで感想後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサソ: 酢酸エチル=100: 0 (v/v) ~60: 40 (v/v)] にて精製し、目的 157g, を得た。

(N (ESI) : (N

[0666] 工程 7 :化合物 42-7

上記工程 6 で得られた化合物 (0.153g, 0.177mmol) の THF (1.8mL) 溶液に、1mol/L のテトラブチルアンモニウムフロリドテトラヒドロフラン溶液 (0.266mL, 0.266mmol) を室温にて加えた。室温にて 50 分間撹拌した後、反応溶液に 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) → 0 : 100 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.115g, 92%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 706(M+H)⁺

[0667] 工程 8 :化合物 42-8

上記工程 7 にて得られた化合物 (0.115g, 0.163mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (1.0mL) 溶液に、1,5-ジブロモペンタン (0.088mL, 0.652mmol)、炭酸セシウム (0.032g, 0.098mmol) を室温で加えた。室温で 2 時間撹拌した後、反応溶液に 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) と飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) → 50 : 50 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.111g, 80%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 856[⁸¹Br, (M+H)⁺], 854[⁷⁹Br, (M+H)⁺]

[0668] 工程 9 :化合物 42-9

上記工程 8 で得られた化合物 (0.105g, 0.123mmol) を実施例 3 工程 7 と同様に反応させ、目的化合物 (0.036g, 41%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 772[⁸¹Br, (M+H)⁺], 770[⁷⁹Br, (M+H)⁺]

[0669] 工程 10 :化合物 42-10

上記工程 9 で得られた化合物 (0.163g, 0.169mmol) を、実施例 3 工程 12 と同様に反応させ、目的化合物 (0.132g, 88%) を得た。

MS (APCI, ESI)m/z : 880(M+H)⁺

[0670] 工程 11 : 化合物 42-1 1

上記工程 10 で得られた化合物 (0.13g, 0.147mmol)、5-[(プロパン-2-エン-1-イルオキシ)カルボニル]アミノ}ペンタン酸 (0.0386g, 0.192mmol) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物 (0.038g, 0.251mmol) のジクロロメタン (3mL) 溶液に、トリエチルアミン (0.035mL, 0.251mmol) と 1-エチル-3-[(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド]塩酸塩 (0.048g, 0.251mmol) を室温で加え、室温で 1 時間撹拌した。反応溶液に 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、酢酸エチルを減圧留去した。トルエン共沸し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 0 (v/v) → 50 : 50 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.150g, 95%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 1063(M+H)⁺

[0671] 工程 12 : 化合物 42-1 2

上記工程 11 で得られた化合物 (0.150g, 0.141mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (3.5mL) 溶液に、室温で酢酸リチウム水溶液 (1.52M, 0.088mL) を加えた。室温で 1.5 時間撹拌後、反应用液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄後、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 100 : 0 (v/v) → 95 : 5 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.135g, 96%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 907(M+H)⁺

[0672] 工程 13 : 化合物 42-1 3

上記工程 12 にて得られた化合物 (0.048g, 0.053mmol) と上記工程 9 にて得られた化合物 (0.034g, 0.048mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (0.5mL) 溶液に、炭酸セシウム (0.011g, 0.034mmol) を室温で加えた。室温で 1.5 時間撹拌した後、45℃ で 5 時間撹拌した。反応溶液に 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を 0.1 規定リン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧留

去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 100 : 0 (v/v) ~ 97 : 3 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.038g, 52%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1534 (M+H) +

[0673] 工程 14 : 化合物 42-1 4

上記工程 13 で得られた化合物 (0.038g, 0.247mmol) を実施例 3 工程 11 と同様に反応させた。反応溶液を分液後、有機溶媒を減圧留去し、得られた化合物をそのまま次の反応で使用した。

MS (APCI, ESI) m/z : 1420 (M+H) +

[0674] 工程 15 : 化合物 42-1 5

上記工程 14 にて得られた化合物 (0.034g, 0.140mmol) のジメチルホルムアミド (2mL) 溶液に、室温にてピロリジン (0.048mL, 0.574mmol)、テトラキス (トリフエニルホスフィン) パラジウム (0) (0.0054g, 0.0046mmol) を加え、室温にて 50 分撹拌した。有機溶媒を減圧留去した後、得られた残渣をジメチルスルホキシドに溶解させ、逆相カラムクロマトグラフィー (column : Develosil Comb i- RP-5 (Nomurachem ical), 20mmx100mm, : 0.1% ギ酸水溶液 : 0.1% アセトニトリル = 79.2 : 20.8 to 51.4 : 48.6, 流速 : 25mL/min, 温度 : 25℃) で精製し、目的化合物 (0.020g, 72%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1168 (M+H) +

[0675] 工程 16 : 化合物 42-1 6

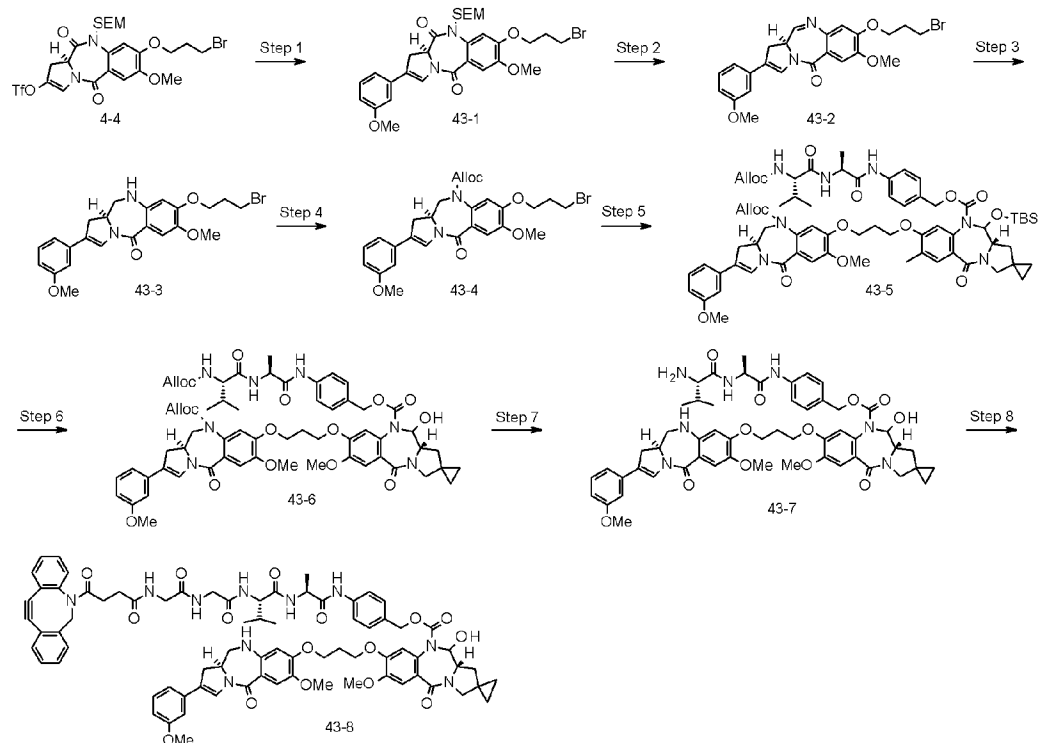
上記工程 15 で得られた化合物 (0.002g, 0.0017mmol) のジメチルホルムアミド (0.5mL) 溶液に、トリエチルアミン (0.007mL, 0.051mmol) と市販の 1- { [4- (11, 12-ジデヒドロベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソプタノイル] オキソピロリジン-2, 5-ジオン (0.083g, 0.0205mmol) を加え、室温にて 10 時間撹拌した。有機溶媒を減圧留去し、得られた残渣をジメチルスルホキシドに溶解させ、逆相カラムクロマトグラフィー (column : Develosil Comb i- RP-5 (Nomurachem ical), 20mmx100mm, : 0.1% ギ酸水溶液 : 0.1% アセトニトリル = 62.5 : 37.5 to 34.7 : 65.3,

流速 : 25mL/min , 温度 : 25℃) 、 およびシリカゲルカラムクロマトグラフィ
 - [クロロホルムークロロホルム : メタノール : 水 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) の
 分配有機層] にて精製し、目的物 (0.033g, 14%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1455 (M+H)⁺

[0676] 実施例43 : 薬物リンカー41

[化167]



工程1 : 化合物43-1

実施例4工程4で得られた化合物 (0.72g, 1.09mmol) と3-メトキシフ
 エニルボロン酸 (0.332g, 2.18mmol) を実施例3工程6と同様に反応させ、
 目的化合物 (0.526g, 78%) を得た。

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

[0677] 工程2 : 化合物43-2

上記工程1で得られた化合物 (0.526g, 0.851mmol) を実施例3工程7と同
 様に反応させ、目的化合物 (0.195g, 49%) を得た。

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

[0678] 工程3 : 化合物 43-3

上記工程2で得られた化合物 (0.195g, 0.414mmol) を実施例3工程8と同様に反応させ、目的化合物 (0.195g, 定量的) を得た。

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

[0679] 工程4 : 化合物 43-4

上記工程3で得られた化合物 (0.413mmol) を実施例3工程9と同様に反応させ、目的化合物 (0.106g, 46%) を得た。

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

[0680] 工程5 : 化合物 43-5

上記工程4で得られた化合物 (0.069g, 0.124mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的化合物 (0.128g, 80%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1284 (M+H)⁺

[0681] 工程6 : 化合物 43-6

上記工程5で得られた化合物 (0.128g, 0.099mmol) を実施例3工程11と同様に反応させ、目的化合物 (0.105g, 90%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1170 (M+H)⁺

[0682] 工程7 : 化合物 43-7

上記工程6で得られた化合物 (0.105g, 0.089mmol) を実施例3工程12と同様に反応させ、目的化合物 (0.072g, 80%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 1002(M+H)⁺

[0683] 工程8 : N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-

イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-

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

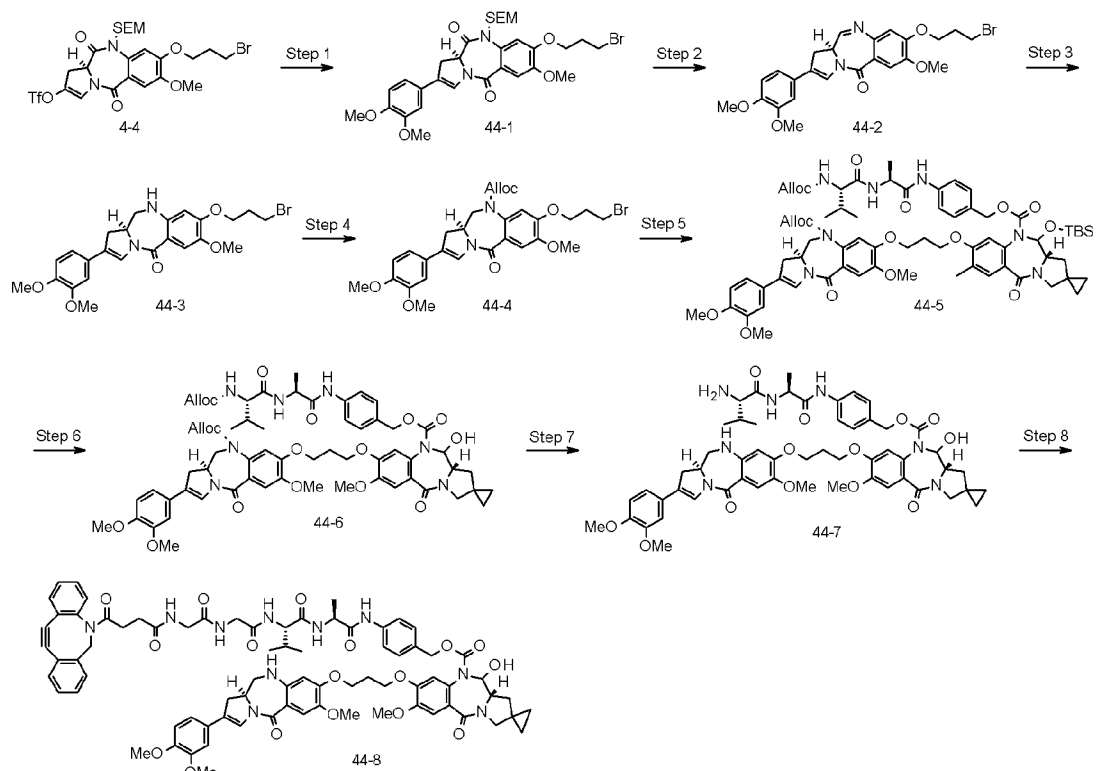
} L-アラニンアミド

上記工程7で得られた化合物 (0.072g, 0.072mmol) を実施例3工程13と同様に反応させ、目的化合物 (0.053g, 52%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1403 (M+H) +

[0684] 実施例44 : 薬物リンカー42

[化168]



工程1 : 化合物44-1

実施例4工程4にて得られた化合物 (0.68g, 1.03mmol) と3,4-ジメトキシフェニルボロン酸 (0.375g, 2.06mmol) を実施例3工程6と同様に反応させ、目的化合物 (0.506g, 75%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 649[⁸¹Br, (M+H)⁺], 647[⁷⁹Br, (M+H)⁺]

[0685] 工程2 : 化合物44-2

上記工程1で得られる化合物 (0.506g, 0.781mmol) を実施例3工程7と同様に反応させ、目的化合物 (0.199g, 50%) を得た。MS(APCI, ESI)m/z : 503[⁸¹Br, (M+H)⁺], 501[⁷⁹Br, (M+H)⁺]

[0686] 工程3 :化合物 44-3

上記工程2で得られる化合物 (0. 169g , 0. 337mmol) を実施例3工程8と同様に反応させ、目的化合物 (0. 231 g, 定量的) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 505[⁸¹Br, (M+H) ⁺], 503[⁷⁹Br, (M+H)+]

[0687] 工程4 :化合物 44-4

上記工程3で得られる化合物 (0. 337mmol) を実施例3工程9と同様に反応させ、目的化合物 (0. 170g, 86%) を得た。

MS(APCI, ESI)m/z : 589[⁸¹Br, (M+H) ⁺], 587[⁷⁹Br, (M+H)+]

[0688] 工程5 :化合物 44-5

上記工程4で得られる化合物 (0. 076g, 0. 136mmol) を実施例3工程10と同様に反応させ、目的化合物 (0. 116g , 71%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1314 (M+ H) +

[0689] 工程6 :化合物 44-6

上記工程5で得られる化合物 (0. 116g , 0. 088mmol) を実施例3工程11と同様に反応させ、目的化合物 (0. 108g , 定量的) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1200 (M+ H) +

[0690] 工程7 :化合物 44-7

上記工程6で得られる化合物 (0. 090mmol) を実施例3工程12と同様に反応させ、目的化合物 (0. 066g, 71%) を得た。 MS(APCI, ESI)m/z : 1032(M+H) +

[0691] 工程8 :N_ [4- (11, 12_ ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)

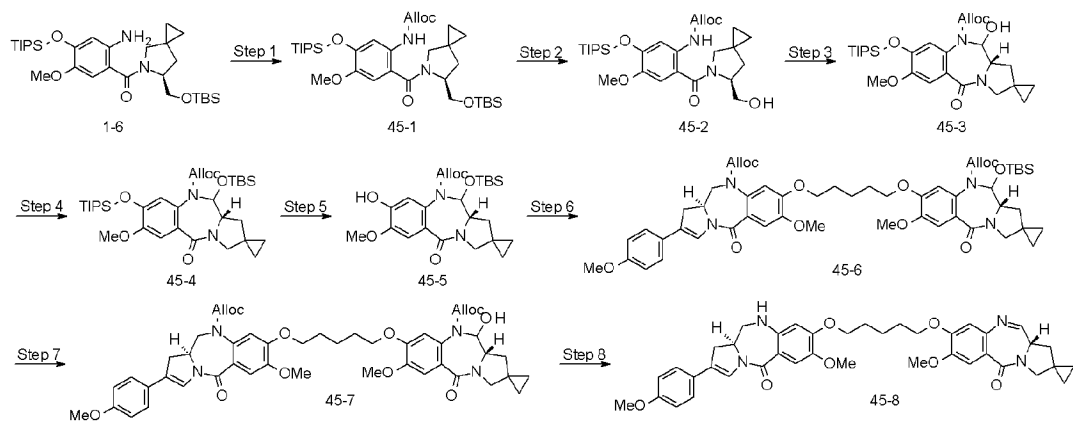
—イル) _ 4—オキソブタノイル] グリシルグリシル—L—バリル—N— {4_ [({ [(11a, S) _8' - (3- { [(11aS) _2_ (3, 4—ジメトキシフェニル) _ 7—メトキシ—5_ オキソ_ 5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_ イル] オキシ} プロポキシ) - 11' —ヒドロキシ—7' —メトキシ—5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ_ Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _ 10' (5' H) —イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} —L—アラニンアミド

上 程 で得 ら れ 合 成 物 を 実 施 例 3 と 同 じ 方 法 に 基 づ き 的 化 合 物 を 得 た

[0692] [薬物Dの合成]

実施例45：薬物1

[化169]



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

実施例1工程5にて得られた化合物を (4. 59g, 8. 15mmol) を、実施例3工程9と同様に反応させ、目的物 (4. 86g, 92%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8. 97 (1H, s), 7. 77 (1H, s), 6. 77 (1H, s), 5. 97-5. 94 (1H, m), 5. 39-5. 21 (2H, m), 4. 67-4. 59 (3H, m), 4. 00-3. 98 (1H, m), 3. 74-3. 66 (5H, m), 3. 05-3. 03 (1H, m), 2. 30-2. 28 (1H, m), 1. 72-1. 70 (1H, m), 1. 30-1. 27 (3H, m), 1. 11-1. 05 (18H, m), 0. 99-0. 91 (9H, m), 0. 61-0. 53 (4H, m), 0. 10-0. 06 (6H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 647 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

[0693] 工程2：プロパ-2-エン-1-イル (2- { [(6S) -6- (ヒドロキシメチル) -5-アザスピロ [2. 4] ヘプト-5-イル] カルボニル} -4-メトキシ-5- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} フェニル) カルバメート

上記工程1にて得られた化合物 (4. 86g, 7. 51mmol) を、実施例1工程7と同様に反応させ、目的物 (3. 42g, 86%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 8. 52(1H, s), 7. 71(1H, s), 6. 77(1H, s), 6. 00–5. 94(1H, m), 5. 35–5. 27(2H, m), 4. 65–4. 64(3H, m), 4. 33–4. 31(1H, m), 3. 82–3. 77(5H, m), 3. 68–3. 66(1H, m), 3. 15–3. 13(1H, m), 1. 89–1. 86(2H, m), 1. 30–1. 26(3H, m), 1. 14–1. 10(18H, m), 0. 66–0. 51(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z: 533(M+H)⁺

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

上記工程2にて得られた化合物 (6. 68g, 12. 5mmol) を、実施例1工程8と同様に反応させ、目的物 (6. 44g, 97%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7. 20(1H, s), 6. 69(1H, s), 5. 89–5. 78(2H, m), 5. 18–5. 15(2H, m), 4. 62–4. 60(1H, m), 4. 49–4. 47(1H, m), 3. 85(3H, s), 3. 74–3. 71(1H, m), 3. 59–3. 57(1H, m), 3. 33–3. 30(2H, m), 2. 43–2. 40(1H, m), 1. 76–1. 73(1H, m), 1. 28–1. 20(3H, m), 1. 09–1. 07(18H, m), 0. 74–0. 65(4H, m).

MS(APCI、ESI)m/z: 531(M+H)⁺

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

上記工程3にて得られた化合物 (3. 24g, 6. 10mmol) を、実施例1工程9と同様に反応させる目的を得た

2

5. 14–5. 10(2H,

[illegible]

工程6にて得られた化合物（実施例）と、同様に反応させた（定量的）を得た。

1

55(3H,

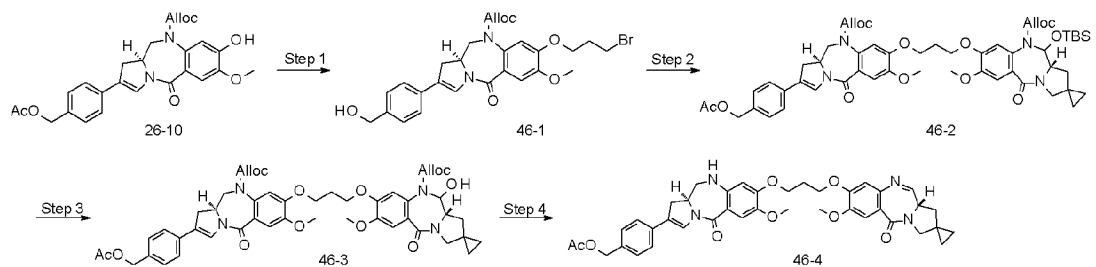
工程 7' ~~キ~~ キ
 キシフ レ オキシ テ ラヒド
 ロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ}
 ペンチル) オキシ] -1' , 11a' -ジヒドロ-5' H-スピロ [シクロプロパ
 ン-1, 2' -ピロロ ソジアゼピン -オン
 上記工程7にて得られた化合物 実施例3工程12と
 同様に反応させ、目的物 (109. 8mg, 99%) を得た。

H, m).

MS(APCI、ESI)m/z:693(M+H)⁺

実施例46：薬物2

[化170]



工程1：化合物46-1

実施例26工程10にて得られた化合物 (0.246g, 0.514mmol) を用いて、実施例4工程1と同様に反応させ、目的物 (0.122g, 40%) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:601 [⁸¹Br, (M+H)⁺], 599 [⁷⁹Br, (M+H)⁺].

工程2：化合物46-2

上記工程1にて得られた化合物 (0.122g, 0.204mmol) を、実施例45工程6と同様に反応させ、目的物 (0.176g, 86%) を得た。

工程3：化合物46-3

上記工程2にて得られた化合物 (0.0870g, 0.0864mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.0660g, 86%) を得た。MS(APCI、ESI)m/z: 892(M+H)⁺

[] 工程4：4- [(11aS) -7-メトキシ-8- (3- { [(11a' S) -7'-メトキシ-5'-オキソ-5', 11a' ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8'-イル] オキシ} プロポキシ) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [1-c] 4] ベンゾジアゼピン 2 イ ベンジル ア テ ト

[07] 工程2: (シジロオキシ) キシ 2 ト1エン

ゾイル] -5-アザスピロ [2, 4] ヘプタシ-6-カルバルディド

上記工程1にて得られた化合物 (4. 50g, 11. 0mmol) を、実施例1工程8と

同 (c) 応 的 (1 94g, 1 得

MS (APCI, ESI) m/z : 411 (M+H) +

[0706] 工程3: (11a' S) -8' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-1' , 10' , 11' , 1

1a' -チトラヒドロ-5' H-スピロ [シクロプロパシ-1, 2' -ピロロ [2,

1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -5' -オシ

上記工程2にて得られた化合物 (1. 94g, 4. 73mmol) のチトラヒドロラ

シ (25mL) 、酢酸エチル (25mL) 、メタノール (25mL) の混合溶液に、窒素

雰囲気下、5%パラジウム炭素 (54%水分、1. 0g) を加えた後、反応溶液を

水素雰囲気下、室温にて22時間撹拌した。反応溶液をセライト濾過した後、

濾液を減圧留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフイ

ー [ヘキサシ: 酢酸エチル=80: 20 (v/v) ~0: 100 (v/v)] にて精製し

、目的物 (1. 20g, 93%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7. 55(1H, s), 6. 16(1H, s), 5. 86(1H, s), 4. 08-4. 02(2H, m), 3. 86(

3H, s), 3. 72-3. 69(1H, m), 3. 57-3. 37(3H, m), 2. 04-2. 01(1H, m), 1. 78-1. 75(1H, m)

, 0. 79-0. 53(4H, m) .

¹³C N (/z 5(N

シ [0707] 工程4: プロゾ-2-エシ-1-イル (11a' S) -8' - [(5 ゴ1 モ シチ

ルオ) オキシ] -11' - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7

' -メトキシ-5' -オキシ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シク

ロプロパシ-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10'

' , カリボキシシ

実施例45工程3にて得られた化合物 (0. 300g, 0. 614mmol) を、実施例3工

2と同 (c)

的

388g

を得

¹H-NMR)

11 (2 1 64(1 2 2 (2

3H, s), 3.72-3.69(1 H, m), 3.54-3.52(1 H, m), 3.46-3.41(2H, m), 3.29-3.26(1 H, m), 2.38-2.34(1 H, m), 1.94-1.87(4H, m), 1.65-1.62(2H, m), 1.55-1.55(1 H, m), 0.86(9H, s), 0.75-0.67(4H, m), 0.24-0.22(6H, m).

MS(APCI、ESI)m/z :639[⁸¹Br, (M+H)⁺], 637[⁷⁹Br, (M+H)⁺].

[0708] 工程5:プロプ—2—エン—1—イル (11a' S) —11' - { [tert —プチル (ジメチル) シリル] オキシ} _7' —メトキシ_8' - [(5- { [(11a' S) -7' —メトキシ—5' —オキソ—5' , 10' , 1Γ , 11a' —テトラヒドロ_1 , H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _8' —イル] オキシ} ペンチル) オキシ] _5' —オキソ—11 , , 11a' —ジヒドロ_Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —カルボキシレート
上記工程4にて得られた化合物 (0.203g, 0.318mmol) と上記工程3にて得られた化合物 (0.131g, 0.478mmol) を、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物 (0.0880g, 33%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z :831 (M+H)⁺

[0709] 工程6:プロプ—2—エン—1—イル (11a' S) —11' —ヒドロキシ_7' - メトキシ_8' - [(5- { [(11a' S) _7' —メトキシ_5' —オキソ—5' , 10' , 1Γ , 11a' —テトラヒドロ—1' H—スピロ [シクロプロパン—1, 2 , —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _8' —イル] オキシ} ペンチル) オキシ] —5' —オキソ—1Γ , 11a' —ジヒドロ_Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) —カルボキシレート

上記工程5にて得られた化合物 (0.0880g, 0.106mmol) を、実施例3工程1と同様に反応させ、目的物 (0.0500g、66%) を得た。

MS (APCI、ESI) m/z :717 (M+H)⁺

[0710] 工程7: (11a' S) _7' —メトキシ_8' - [(5— { [(11a' S) -7' —メトキシ—5' —オキソ—5' , 11a' —ジヒドロ_Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —8' —イル]

オキシ}ベンチル)オキシ]-1', 10', 11', 11a'-テトラヒドロ-5'-
 H-スピロ[シクロプロパン-1 2 エピ [2, [1, 2, 3]

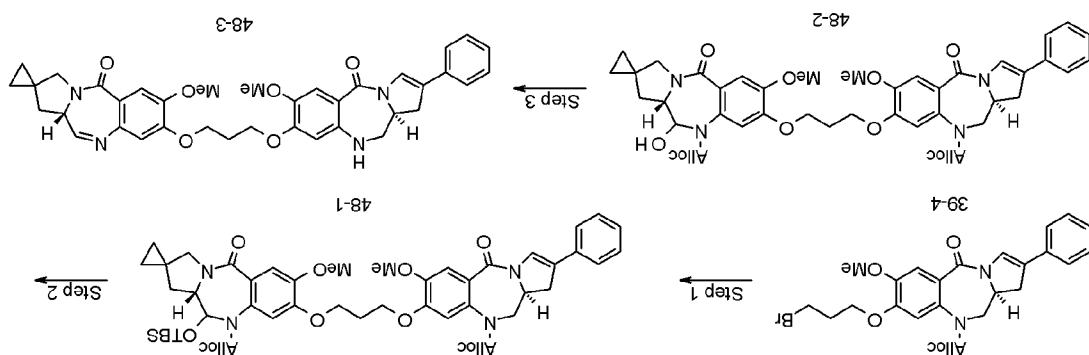
上記工程6にて得られた化合物 (0.0500g, 0.0698mmol) を実施例3工程12
 と同様に反応させ、目的物 (0.0330g, 77%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.80(1H, m), 7.58(1H, s), 7.52(1H, s), 6.81(1H, s), 6.05(1H, s),
 4.17-3.97(5H, m), 3.94(3H, s), 3.87(1H, m), 3.84(3H, s), 3.72-3.68(3H, m), 3.5
 1-3.45(5H, m), 2.54-2.51(1H, m), 2.03-1.90(6H, m), 1.75-1.68(2H, m), 0.66(8H,
 m).

MS(APCI, ESI) m/z: 615(M+H)⁺

[0711] 実施例48: 薬物4

[化172]



工程1: 化合物48-1

実施例39工程4にて得られた化合物 (0.165g, 0.313mmol) を、実施例4
 5工程6と同様に反応させ、目的物 (0.270g, 92%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z: 935 (M+H)⁺.

2] 工程2: 化合物48-2

上記工程1にて得られた化合物 (0.270g, 0.289mmol) を、実施例3工程11
 と同様に反応させ、目的物 (0.208g, 77%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z: 821 (M+H)⁺.

[0713] 工程3: (11a' S) -7' -メトキシ-8' - (3- { [(11a S) -7-メトキシ
 -5-オキシ-2-フェニル-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロ-ロ

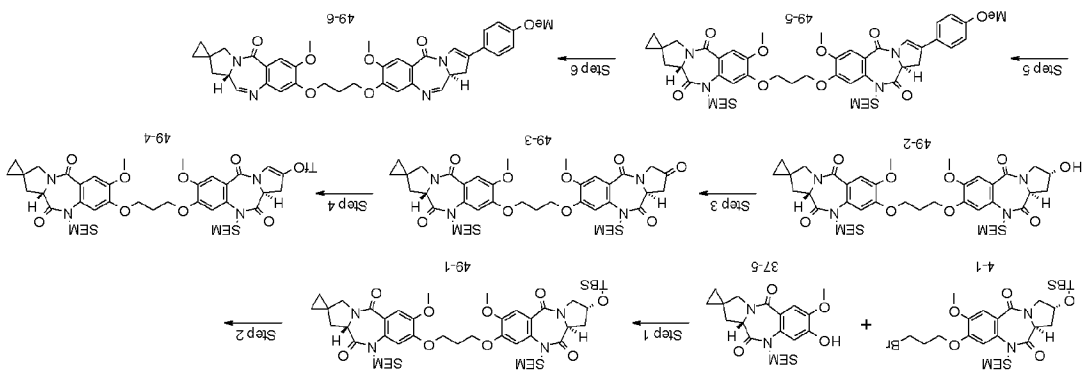
[2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ) -1
, 11a' -ジエトロ-5' H-スエロ [シクロプロパシ-1, 2' -エトロ
2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5' -オシ

上記工程2にて得られた化合物 (0. 208g, 0. 253mmol) を、実施例3工程12
と同様に反応させ、目的物 (0. 130g, 80%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 635 (M+H) +.

[0714] 実施例49：薬物5

[化173]



工程1：化合物49-1

化合物4-1 (8. 52g, 13. 2mmol) と実施例37工程4にて得られた化合物37-5
(6. 09g, 14. 5mmol) を用いて、実施例3工程10と同様に反応させ、目的物

(10. 7g, 83%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7. 36(1H, s), 7. 34(1H, s), 7. 26(1H, s), 7. 23(1H, s), 5. 53-5. 46(2H, m), 4. 72-4. 69(2H, m), 4. 59-4. 55(1H, m), 4. 28-4. 20(6H, m), 3. 90-3. 89(6H, m), 3. 80-3. 63(6H, m), 3. 57-3. 54(1H, m), 3. 42-3. 39(1H, m), 2. 87-2. 82(1H, m), 2. 47-2. 40(3H, m), 2. 24-2. 20(1H, m), 2. 04-1. 99(1H, m), 0. 99-0. 95(4H, m), 0. 87(9H, s), 0. 70-0. 63(4H, m), 0. 09(6H, s), 0. 02-0. 00(18H, m).

[0715] 工程2：化合物49-2

上記工程1にて得られた化合物 (10. 7g, 10. 9mmol) を実施例3工程3と同
じ条件で反応させ、目的物 (9. 45g, 83%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7. 36(1H, s), 7. 34(1H, s), 7. 26(1H, s), 7. 23(1H, s), 5. 53-5. 46(2H, m), 4. 72-4. 69(2H, m), 4. 59-4. 55(1H, m), 4. 28-4. 20(6H, m), 3. 90-3. 89(6H, m), 3. 80-3. 63(6H, m), 3. 57-3. 54(1H, m), 3. 42-3. 39(1H, m), 2. 87-2. 82(1H, m), 2. 47-2. 40(3H, m), 2. 24-2. 20(1H, m), 2. 04-1. 99(1H, m), 0. 99-0. 95(4H, m), 0. 87(9H, s), 0. 70-0. 63(4H, m), 0. 09(6H, s), 0. 02-0. 00(18H, m).

19 工 器 : (11a' S) - 7' - × ト キ シ - 8' - (3 - - { [(11a S) - 7' - × ト キ シ

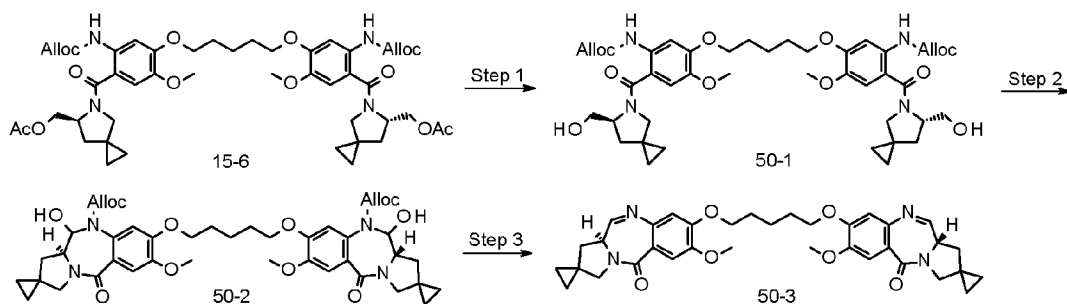
-2- (4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5,11a-ジヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-1,11a'-ジヒドロ-5'-H-スピロ[シクロプロパン-1,2'-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン]-5'-オン

上記工程5にて得られた化合物 (0.900g, 0.942 mmol) の THF (30 mL), エタノール (3 mL) 溶液に、0℃にて水素化ホウ素リチウム (0.456g, 18.8mmol) をゆっくりと加えた。反応混合物を室温にて、1.5時間攪拌した後、反応混合物に水を加え、激しく攪拌した。反応混合物をクロロホルムで抽出し。有機層を減圧留去し、得られた残渣をジクロロメタン (10mL)、エタノール (20 mL)、水 (5mL) に溶解させた。反応混合物に、シリカゲル (15.0g) を加え、窒素雰囲気下、3日間攪拌した。反応混合物を濾過し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後、減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム : メタノール = 100 : 0 (v/v) → 92 : 8 (v/v)] にて精製し、目的物 (0.308g, 49%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 663 (M+H) +

[0720] 実施例 50 : 薬物 6

[化 174]



工程 1 : ジ-2-プロペン-1-イル {1,5-ペンタンジイルビス[オキシ(6-{[(6S)-6-(ヒドロキシメチル)-5-アザスピロ[2.4]ヘプト-5-イル]カルボニル}-4-メトキシベンゼン-3,1-ジイル)]}ビスカルバメート

実施例15工程5にて得られたビスアリルオキシカルボニル体15-6 (0.460g, 0.508mmol) をメタノール (10mL) に溶解した後、炭酸カリウム (351mg, 2.54mmol) を加え、室温で30分撹拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液50mLを加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。減圧留去し、目的物 (0.421g, 定量的) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 9.19(2H, s), 7.22(2H, s), 6.89(2H, s), 5.97-5.92(2H, m), 5.33(2H, m), 5.22(2H, m), 4.81(2H, m), 4.55(4H, m), 4.26(2H, s), 3.96(4H, m), 3.74(6H, s), 3.62(2H, m), 3.56(2H, s), 3.37(2H, m), 3.11(2H, m), 1.88-1.78(8H, m), 1.56-1.54(2H, m), 0.54-0.43(8H, m).

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

[0721] 工程2: ジプロプ-2-エン-1-イル (11a' S, 11a' ' ' ' S) -8' , 8' ' - [ペンタン-1, 5-ジイルビス (オキシ)] ビス (11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-5' -オキソ-11' , 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボキシレート)

上記工程1にて得られた化合物 (0.421g, 0.513mmol) を、実施例15工程8と同様に反応させ、目的物 (0.326g, 78%) を得た。

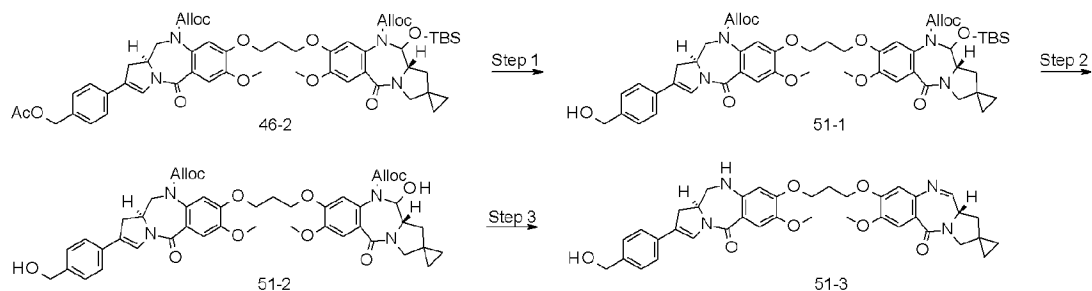
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 7.07(2H, s), 6.80(2H, s), 6.55(2H, m), 5.84-5.81(2H, m), 5.75(2H, m), 5.09-5.05(4H, m), 4.62(2H, mz), 4.40(2H, m), 3.98(4H, m), 3.81(6H, s), 3.54(2H, m), 3.43-3.37(2H, m), 3.14(2H, m), 2.35(2H, m), 1.81-1.79(4H, m), 1.59-1.56(4H, m), 0.70-0.59(8H, m). MS(APCI, ESI)m/z: 817(M+H) $^+$.

[0722] 工程3: (11a' S, 11a' ' ' ' S) -8' , 8' ' - [1, 5-ペンタンジイルビス (オキシ)] ビス (7' -メトキシ-1' , 11a' -ジヒドロ-5' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -5' -オン)

上記工程2にて得られた化合物 (0.326g, 0.399mmol) を、実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.208g, 85%) を得た。

(M+H)⁺.

実施 薬物7



工程1：化合物51-1

化合物46-2 (0.0870g, 0.0863mmol) を、実施例27工程1と同様に反応させ、目的物 (0.0660mg, 79%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.50(1H, s), 7.36–7.34(4H, m), 7.27–7.24(2H, m), 6.80(1H, s), 6.64(1H, s), 6.03(1H, m), 5.80–5.74(2H, m), 5.10–5.06(3H, m), 4.70(2H, m), 4.67–4.60(2H, m), 4.41–4.37(3H, m), 4.23–4.20(6H, m), 3.90(3H, s), 3.89(3H, s), 3.72(1H, m), 3.65–3.62(1H, m), 3.51(1H, m), 3.34–3.26(2H, m), 2.75–2.71(1H, m), 2.39–2.35(3H, m), 1.74(1H, m), 1.56–1.52(1H, m), 0.85(9H, s), 0.80–0.62(4H, m), 0.22(3H, s), 0.21(3H, s).

MS (APCI、ESI) m/z : 965 (M+H)⁺.

工程2：化合物51-2

上記工程1にて得られた化合物 (0.0660g, 0.0683mmol) を、実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.0590g, 定量的) を得た。

MS(APCI、ESI)m/z:851(M+H)⁺.

工程3: (11a' S) –8' – [3 – ({ (11aS) –2 – [4 – (ヒドロキシメチル) フェニル] –7 –メトキシ –5 –オキソ –5, 10, 11, 11a –テトラヒドロ –1
ピロリジン アゼピン イル } オキシ) ロポ

キシ] -7' -メトキシ-1' , 11a' -ジクロ-5' H-スピロ [シクロプロ
パン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ペンゾジアゼピン] -5' -オソ

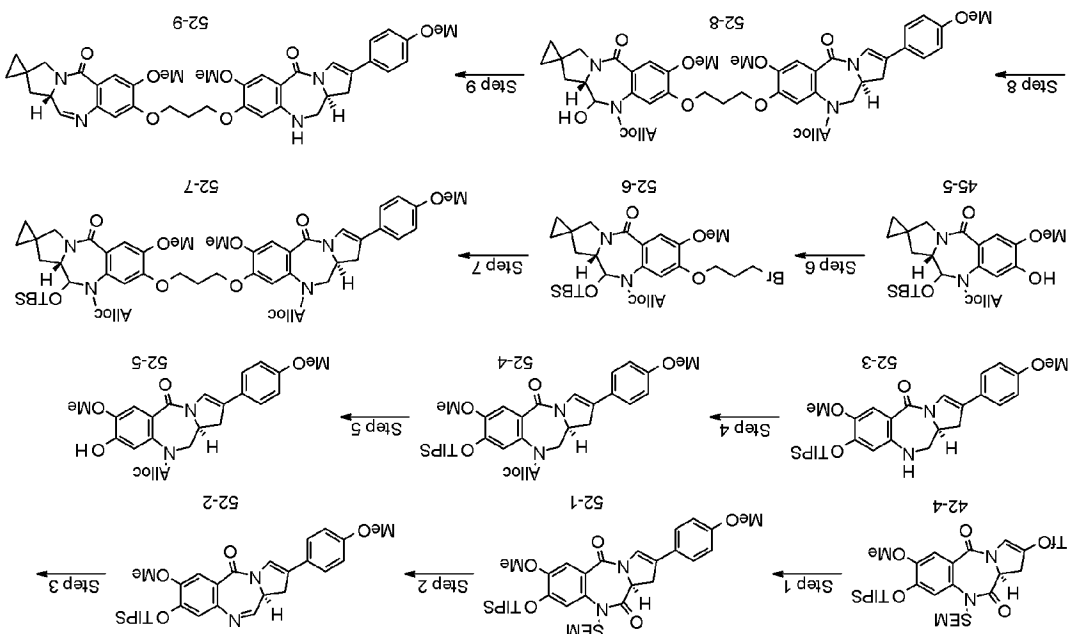
上記工程2にて得られた化合物 (0.0590g, 0.0693mmol) を、実施例3工程1
2と同様に反応を行ない、目的物 (0.0290g, 63%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.80-7.79(1H, m), 7.64-7.64(1H, m), 7.52-7.51(2H, m), 7.36-7.
.33(4H, m), 6.85(1H, m), 6.14(1H, m), 4.69(2H, m), 4.30-4.26(6H, m), 3.95-3.95(
3H, m), 3.86-3.84(3H, m), 3.67(1H, m), 3.56-3.54(2H, m), 3.50-3.48(2H, m), 3.39
-3.30(1H, m), 2.80-2.73(1H, m), 2.52(1H, m), 2.41-2.39(2H, m), 2.00(1H, m), 1.7
3-1.72(1H, m), 0.76-0.70(4H, m).

MS(APCI, ESI)m/z: 665(M+H)⁺.

2] 実施例52 : 薬物8

[化176]



工程1 : (11a) -7'-メトキシ-2-(4'-メトキシフェニル) 0 [2-
(トリメチルシリル) エトキシ] メチル} -8- [トリ (プロパン-2-イ
ル) シリル] オキシ} -1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ペンゾジアゼピン-
5 (10H, 11aH) ジオ

実施例42工程4で得られた化合物 (0.519g, 0.747mmol) を、実施例3工程

6と同様に反応させ、目的化合物 (0. 511g, 定量的) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4. 57(1H, m), 3. 97-3. 90(1H, m), 3. 88(3H, s), 3. 83(3H, s), 3. 75-3. 56(2H, m), 3. 19-3. 09(1H, m), 1. 36-1. 23(3H, m), 1. 11(18H, m), 1. 02-0. 97(2H, m), 0. 03(9H, s).

MS (APCI, ESI) m/z : 653[(M+H)⁺]

] 工程2: (11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -8- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -1, 11a-ジヒドロ-5H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5-オン

上記工程1で得られた化合物 (0. 178g, 0. 272mmol) を、実施例3工程7と同様に反応させ、目的化合物 (0. 094g, 68%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7. 87(1H, m), 7. 51(1H, s), 7. 41-7. 39(1H, m), 7. 36-7. 33(2H, m), 6. 93-6. 89(2H, m), 6. 86(1H, s), 4. 44-4. 38(1H, m), 3. 90(3H, s), 3. 83(3H, s), 3. 61-3. 53(1H, m), 3. 41-3. 34(1H, m), 1. 33-1. 25(3H, m), 1. 11-1. 06(18H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 507(M+H)⁺

工程3: (11aS) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -8- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -1, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-5H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-5-オン

上記工程2で得られた化合物 (0. 063g, 0. 124mmol) を用いて、実施例3工程8と同様に反応させ、目的化合物 (0. 046g, 72%) を得た。

(18H, m)

キシフェニル) -5-オキソ-8- { [トリ (プロパン-2-イル) シリル] オキシ} -ジヒドロ-ピロロ [1-c] -ベンゾジアゼピン-10 (5H) -カルボキシレート

上記工程で化合物を用い、実施工

程9と同様に反応させ、目的化合物 (0.039, 56%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.39-7.36(1H, m), 7.31-7.28(2H, m), 7.22(1H, s), 6.90-6.86(3H, m), 6.75-6.72(1H, m), 5.82-5.69(1H, m), 5.18-5.08(2H, m), 4.59-4.52(1H, m), 4.48-4.39(1H, m), 4.39-4.29(1H, m), 4.23-4.12(1H, m), 3.86(3H, s), 3.82(3H, s), 3.64-3.58(1H, m), 3.32-3.25(1H, m), 2.73-2.65(1H, m), 1.30-1.20(2H, m), 1.12-1.06(18H, m). MS (APCI, ESI) m/z: 593 (M+H) +

[0731] 工程5: プロゾ-2-エソ-1-イル (11aS) -8-ヒドロキシ-7-メトキシ

-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-11, 11a-ジヒドロ-1H-ピロ

ロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-10 (5H) -カルボキシレート

上記工程4で得られた化合物 (0.030g, 0.050mmol) を、実施例1工程10と同様に反応させ、目的化合物 (0.015g, 0.034mmol) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.39-7.25(4H, m), 6.92-6.78(3H, m), 6.03-5.92(1H, m), 5.86-5.68(1H, m), 5.20-5.07(2H, m), 4.66-4.57(1H, m), 4.52-4.40(1H, m), 4.40-4.27(1H, m), 4.27-4.16(1H, m), 3.95(3H, s), 3.82(3H, s), 3.66-3.59(1H, m), 3.32-3.21(1H, m), 2.74-2.64(1H, m).

MS(APCI, ESI)m/z: 437(M+H) +

[0732] 工程6: プロゾ-2-エソ-1-イル (11a' S) -8' - (3-プロモプロポキ

シ) -11' - { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7' -メトキ

シ-5' -オキソ-11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパシ

-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -

カルボキシレート

実施例45工程5で得られた化合物 (0.131g, 0.268mmol) を実施例4工程1

と同様に反応させ、目的化合物 (0.05g, 0.131mmol) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.21(1H, m), 7.19(1H, m), 7.17(1H, m), 7.15(1H, m), 7.13(1H, m), 7.11(1H, m), 7.09(1H, m), 7.07(1H, m), 7.05(1H, m), 7.03(1H, m), 7.01(1H, m), 6.99(1H, m), 6.97(1H, m), 6.95(1H, m), 6.93(1H, m), 6.91(1H, m), 6.89(1H, m), 6.87(1H, m), 6.85(1H, m), 6.83(1H, m), 6.81(1H, m), 6.79(1H, m), 6.77(1H, m), 6.75(1H, m), 6.73(1H, m), 6.71(1H, m), 6.69(1H, m), 6.67(1H, m), 6.65(1H, m), 6.63(1H, m), 6.61(1H, m), 6.59(1H, m), 6.57(1H, m), 6.55(1H, m), 6.53(1H, m), 6.51(1H, m), 6.49(1H, m), 6.47(1H, m), 6.45(1H, m), 6.43(1H, m), 6.41(1H, m), 6.39(1H, m), 6.37(1H, m), 6.35(1H, m), 6.33(1H, m), 6.31(1H, m), 6.29(1H, m), 6.27(1H, m), 6.25(1H, m), 6.23(1H, m), 6.21(1H, m), 6.19(1H, m), 6.17(1H, m), 6.15(1H, m), 6.13(1H, m), 6.11(1H, m), 6.09(1H, m), 6.07(1H, m), 6.05(1H, m), 6.03(1H, m), 6.01(1H, m), 5.99(1H, m), 5.97(1H, m), 5.95(1H, m), 5.93(1H, m), 5.91(1H, m), 5.89(1H, m), 5.87(1H, m), 5.85(1H, m), 5.83(1H, m), 5.81(1H, m), 5.79(1H, m), 5.77(1H, m), 5.75(1H, m), 5.73(1H, m), 5.71(1H, m), 5.69(1H, m), 5.67(1H, m), 5.65(1H, m), 5.63(1H, m), 5.61(1H, m), 5.59(1H, m), 5.57(1H, m), 5.55(1H, m), 5.53(1H, m), 5.51(1H, m), 5.49(1H, m), 5.47(1H, m), 5.45(1H, m), 5.43(1H, m), 5.41(1H, m), 5.39(1H, m), 5.37(1H, m), 5.35(1H, m), 5.33(1H, m), 5.31(1H, m), 5.29(1H, m), 5.27(1H, m), 5.25(1H, m), 5.23(1H, m), 5.21(1H, m), 5.19(1H, m), 5.17(1H, m), 5.15(1H, m), 5.13(1H, m), 5.11(1H, m), 5.09(1H, m), 5.07(1H, m), 5.05(1H, m), 5.03(1H, m), 5.01(1H, m), 4.99(1H, m), 4.97(1H, m), 4.95(1H, m), 4.93(1H, m), 4.91(1H, m), 4.89(1H, m), 4.87(1H, m), 4.85(1H, m), 4.83(1H, m), 4.81(1H, m), 4.79(1H, m), 4.77(1H, m), 4.75(1H, m), 4.73(1H, m), 4.71(1H, m), 4.69(1H, m), 4.67(1H, m), 4.65(1H, m), 4.63(1H, m), 4.61(1H, m), 4.59(1H, m), 4.57(1H, m), 4.55(1H, m), 4.53(1H, m), 4.51(1H, m), 4.49(1H, m), 4.47(1H, m), 4.45(1H, m), 4.43(1H, m), 4.41(1H, m), 4.39(1H, m), 4.37(1H, m), 4.35(1H, m), 4.33(1H, m), 4.31(1H, m), 4.29(1H, m), 4.27(1H, m), 4.25(1H, m), 4.23(1H, m), 4.21(1H, m), 4.19(1H, m), 4.17(1H, m), 4.15(1H, m), 4.13(1H, m), 4.11(1H, m), 4.09(1H, m), 4.07(1H, m), 4.05(1H, m), 4.03(1H, m), 4.01(1H, m), 3.99(1H, m), 3.97(1H, m), 3.95(1H, m), 3.93(1H, m), 3.91(1H, m), 3.89(1H, m), 3.87(1H, m), 3.85(1H, m), 3.83(1H, m), 3.81(1H, m), 3.79(1H, m), 3.77(1H, m), 3.75(1H, m), 3.73(1H, m), 3.71(1H, m), 3.69(1H, m), 3.67(1H, m), 3.65(1H, m), 3.63(1H, m), 3.61(1H, m), 3.59(1H, m), 3.57(1H, m), 3.55(1H, m), 3.53(1H, m), 3.51(1H, m), 3.49(1H, m), 3.47(1H, m), 3.45(1H, m), 3.43(1H, m), 3.41(1H, m), 3.39(1H, m), 3.37(1H, m), 3.35(1H, m), 3.33(1H, m), 3.31(1H, m), 3.29(1H, m), 3.27(1H, m), 3.25(1H, m), 3.23(1H, m), 3.21(1H, m), 3.19(1H, m), 3.17(1H, m), 3.15(1H, m), 3.13(1H, m), 3.11(1H, m), 3.09(1H, m), 3.07(1H, m), 3.05(1H, m), 3.03(1H, m), 3.01(1H, m), 2.99(1H, m), 2.97(1H, m), 2.95(1H, m), 2.93(1H, m), 2.91(1H, m), 2.89(1H, m), 2.87(1H, m), 2.85(1H, m), 2.83(1H, m), 2.81(1H, m), 2.79(1H, m), 2.77(1H, m), 2.75(1H, m), 2.73(1H, m), 2.71(1H, m), 2.69(1H, m), 2.67(1H, m), 2.65(1H, m), 2.63(1H, m), 2.61(1H, m), 2.59(1H, m), 2.57(1H, m), 2.55(1H, m), 2.53(1H, m), 2.51(1H, m), 2.49(1H, m), 2.47(1H, m), 2.45(1H, m), 2.43(1H, m), 2.41(1H, m), 2.39(1H, m), 2.37(1H, m), 2.35(1H, m), 2.33(1H, m), 2.31(1H, m), 2.29(1H, m), 2.27(1H, m), 2.25(1H, m), 2.23(1H, m), 2.21(1H, m), 2.19(1H, m), 2.17(1H, m), 2.15(1H, m), 2.13(1H, m), 2.11(1H, m), 2.09(1H, m), 2.07(1H, m), 2.05(1H, m), 2.03(1H, m), 2.01(1H, m), 1.99(1H, m), 1.97(1H, m), 1.95(1H, m), 1.93(1H, m), 1.91(1H, m), 1.89(1H, m), 1.87(1H, m), 1.85(1H, m), 1.83(1H, m), 1.81(1H, m), 1.79(1H, m), 1.77(1H, m), 1.75(1H, m), 1.73(1H, m), 1.71(1H, m), 1.69(1H, m), 1.67(1H, m), 1.65(1H, m), 1.63(1H, m), 1.61(1H, m), 1.59(1H, m), 1.57(1H, m), 1.55(1H, m), 1.53(1H, m), 1.51(1H, m), 1.49(1H, m), 1.47(1H, m), 1.45(1H, m), 1.43(1H, m), 1.41(1H, m), 1.39(1H, m), 1.37(1H, m), 1.35(1H, m), 1.33(1H, m), 1.31(1H, m), 1.29(1H, m), 1.27(1H, m), 1.25(1H, m), 1.23(1H, m), 1.21(1H, m), 1.19(1H, m), 1.17(1H, m), 1.15(1H, m), 1.13(1H, m), 1.11(1H, m), 1.09(1H, m), 1.07(1H, m), 1.05(1H, m), 1.03(1H, m), 1.01(1H, m), 0.99(1H, m), 0.97(1H, m), 0.95(1H, m), 0.93(1H, m), 0.91(1H, m), 0.89(1H, m), 0.87(1H, m), 0.85(1H, m), 0.83(1H, m), 0.81(1H, m), 0.79(1H, m), 0.77(1H, m), 0.75(1H, m), 0.73(1H, m), 0.71(1H, m), 0.69(1H, m), 0.67(1H, m), 0.65(1H, m), 0.63(1H, m), 0.61(1H, m), 0.59(1H, m), 0.57(1H, m), 0.55(1H, m), 0.53(1H, m), 0.51(1H, m), 0.49(1H, m), 0.47(1H, m), 0.45(1H, m), 0.43(1H, m), 0.41(1H, m), 0.39(1H, m), 0.37(1H, m), 0.35(1H, m), 0.33(1H, m), 0.31(1H, m), 0.29(1H, m), 0.27(1H, m), 0.25(1H, m), 0.23(1H, m), 0.21(1H, m), 0.19(1H, m), 0.17(1H, m), 0.15(1H, m), 0.13(1H, m), 0.11(1H, m), 0.09(1H, m), 0.07(1H, m), 0.05(1H, m), 0.03(1H, m), 0.01(1H, m).

)+]

[0733] 工程7: プロポ—2—エン—1—イル (11a, S) —11' - { [tert —プチル (ジメチル) シリル] オキシ} _7' —メトキシ_8' - [3- ({ (11aS) - 7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) _5_ オキソ_ 10_ [(プロポ—2—エン_ 1_ イルオキシ) カルボニル] _ 5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H—ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル} オキシ) プロボキシ] —5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ_ Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —カルボキシレート

上記工程5で得られた化合物 (0. 015g, 0. 034mmol) と上記工程6で得られた化合物 (0. 030g, 0. 048mmol) を実施例3工程10と同様に反応させ、目的化合物 (0. 032g, 96%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z :965 (M+ H) +

[0734] 工程8: プロポ—2—エン_ 1—イル (11a' S) —11' —ヒドロキシ_7' - メトキシ—8' - [3- ({ (11aS) _ 7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) _5_ オキソ_ 10_ [(プロポ—2—エン_ 1_ イルオキシ) カルボニル] -5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H_ ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン—8—イル} オキシ) プロボキシ] _5' —オキソ—1Γ, 11a' —ジヒドロ_ Γ H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] —10' (5' H) —カルボキシレート

上記工程7で得られた化合物 (0. 031 g, 0. 032mmol) を実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0. 026g, 95%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z :851 (M+ H) +

[0735] 工程9: (11a' S) _7' —メトキシ_8' _ (3— { [(11aS) _ 7—メトキシ—2— (4—メトキシフェニル) _5_ オキソ_ 5, 10, 11, 11a—テトラヒドロ—1H_ ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン_8_ イル] オキシ} プロボキシ) —Γ, 11a' —ジヒドロ—5' H—スピロ [シクロプロパン—1, 2' —ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] _5' —オン

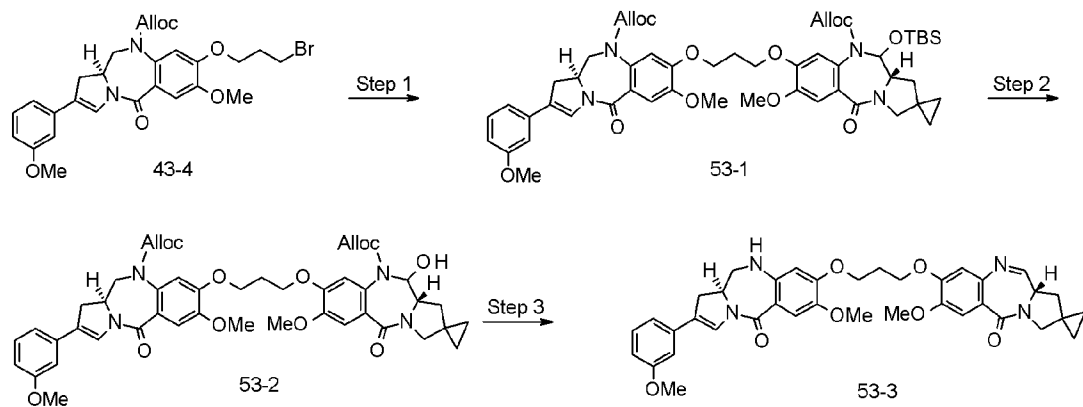
上記工程8で得られた化合物 (0.026g, 0.030mmol) を実施例3工程12と同様に反応させ、目的物 (0.018g, 88%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.80 (1H, m), 7.54–7.51 (3H, m), 7.33–7.29 (2H, m), 6.91–6.85 (3H, m), 6.14 (1H, s), 4.35–4.17 (6H, m), 3.95 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.76–3.25 (5H, m), 2.79–2.69 (1H, m), 2.52 (1H, m), 2.45–2.35 (1H, m), 2.03–1.96 (1H, m), 1.28–1.23 (2H, m), 0.78–0.69 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 665 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

[0736] 実施例53：薬物9

[化177]



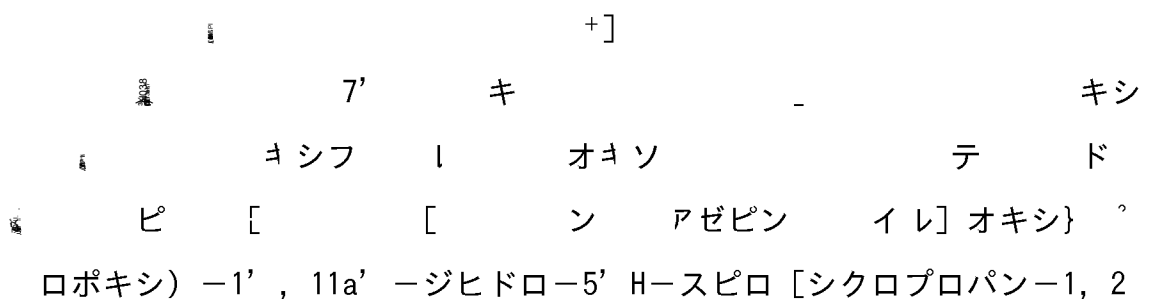
工程1：化合物53-1

実施例43工程4で得られた化合物 (0.027g, 0.048mmol) を、実施例45工程6と同様に反応させ、目的化合物 (0.037g, 79%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 965 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

[0737] 工程2：化合物53-2

上記工程1で得られた化合物 (0.037g, 0.038mmol) を実施例3工程11と同様に反応させ、目的物 (0.037g, 79%) を得た。



ピロリジン [2, 4] ピンアゼピン-オン

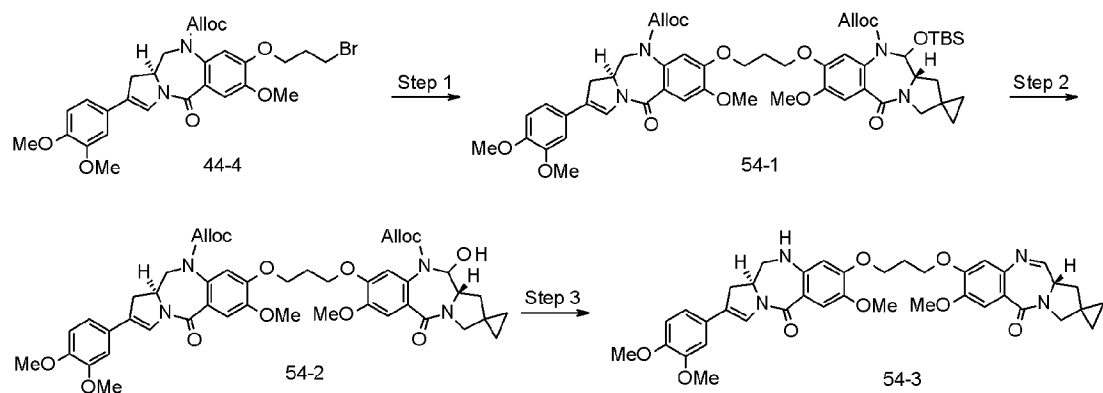
上記工程2で得られた化合物 (0. 038mmol) を実施例45工程6～8と同様に反応させ、目的物 (25mg, 99%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.81–7.78 (1H, m), 7.65–7.62 (1H, m), 7.53–7.49 (2H, m), 7.24 (1H, m), 6.96 (1H, m), 6.91–6.88 (1H, m), 6.85 (1H, m), 6.78 (1H, m), 6.14 (1H, m), 4.41–4.18 (5H, m), 3.97–3.92 (3H, m), 3.88–3.84 (3H, m), 3.83 (3H, s), 3.76–3.25 (5H, m), 2.78–2.71 (1H, m), 2.52 (1H, m), 2.45–2.35 (2H, m), 2.03–1.96 (1H, m), 1.29–1.21 (2H, m), 0.78–0.69 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z : 664 (M+H)⁺

[0739] 実施例54 : 薬物10

[化178]



工程1 : 化合物54-1

実施例44工程4で得られた化合物 (0. 027g, 0. 046mmol) を実施例45工程6と同様に反応させ、目的化合物 (0. 037g, 81%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 995 (M+H)⁺

[0740] 工程2 : 化合物54-2

上記工程1で得られた化合物 (0. 037g, 0. 037mmol) を実施例3工程11と同様に反応させる (定量的) を得た

0741

ニ ヨ オキソ

4-ジメキシフ

テラヒドピ

ロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロポキシ
) -7' -メトキシ-1' , 11a' -ジヒドロ-5' H-スピロ [シクロプロパン

ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン -オン

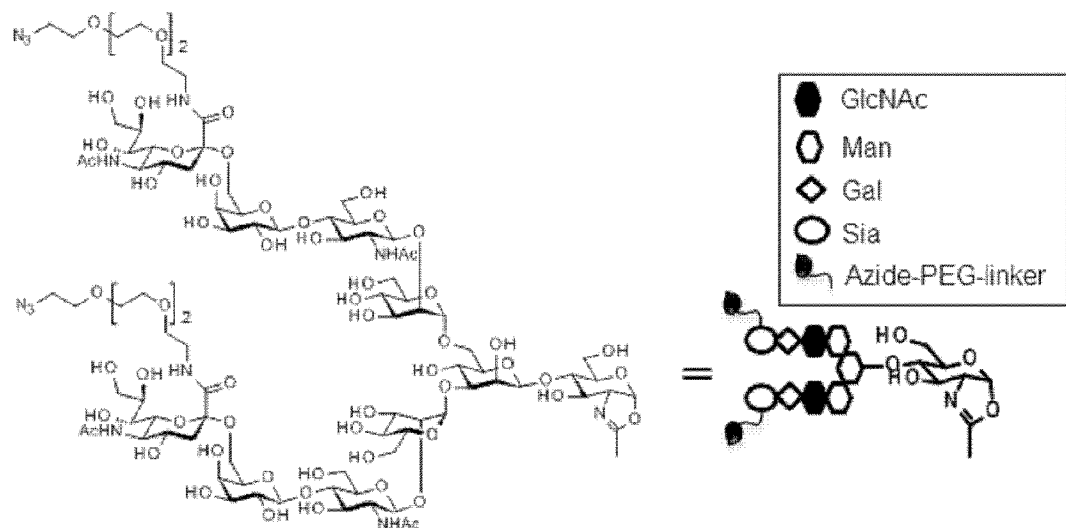
上記工程2で得られた化合物 (0.037mmol) を実施例3工程12と同様に反応
させ、 的 定量的) を得た

$l_3) \delta$

[0742] [糖鎖ドナーの合成]

実施例55: $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)-Ox$

[化179]



(上記の図において、構造式の右の模式図は、実施例58の反応式に表示されるアジド基が導入されたリンカー構造を有する中間体の模式図中の対応構造を示す。)

[0743] 工程1: $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)$

5mlサンプリングチューブ ((株) イナ・オプティカ) に、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミン (0.096mL, 0.485mmol)、ジシアロオクタサッカリド (50 mg, 0.24mmol) の水溶液 (0.5mL) を加え、

1時間撹拌した後、凍結乾燥した。凍結乾燥後の5mLサンプリングチューブに、0.1 (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (92mg, 0.24mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (0.6mL) とジイソプロピルエチルアミン (0.042mL, 0.24mmol) を加え、37℃で4時間撹拌した。反応終了後、あらかじめジエチルエーテル (20mL) を加えた遠沈管 (50mL) に反応液を移した。小型遠心機 (日立エ機、CF16RX) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。ジエチルエーテル (20mL) を加えて、デカンテーションした。続いて、アセトニトリル (20mL) を加えて、デカンテーションした後に、減圧下乾燥し、粗生成物を得た。得られた固形物を適量の0.2% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解させ、逆相 HPLC 分離精製した。0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置には Purif-Rp2 (昭光サイエンティフィック製) を使用し、カラムには Inertsil ODS-3 (GLサイエンス製) を使用した。溶出中にUV検出 (220nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、目的物 (42mg) を得た。

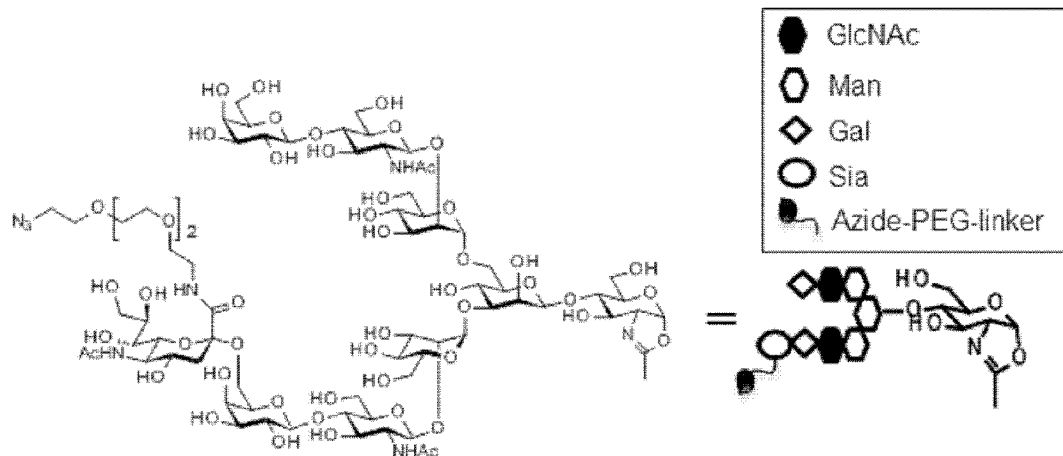
[0744] 工程2: [N₃-PEG (3)]₂-SG (10)-Ox

5mL サンプリングチューブ (株) イナ . オプティカ製) に、上記工程1で合成した化合物 (40mg)、2,2-クロロ-1,3-ジメチル-1H-ベンズイミダゾール-3-イルイウム-クロライド (伏見製薬所製、17.9mg, 0.083mmol) の水溶液 (200μl) を加えた。氷冷後の反応液にリン酸三カリウム (52.6 mg, 0.25mmol) の水溶液 (200μl) を加え、氷冷下で2時間撹拌した。得られた反応液を、アミコンウルトラ (ウルトラセル 30K、Merck Millipore 製) を用いて限外ろ過し、固形物を除去した。その通過液を、ゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した。装置には Purif-Rp2 (昭光サイエンティフィック製) を使用し、カラムには HiPrep 26/10 Desalting (GEヘルスケア製) を使用し、移動相に0.03% - NH₃水溶液を使用し、流速を10mL/min、分画容量を10mLとした。溶出中にUV検出 (220nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、1N水酸化ナトリウム水溶液 (33μl, 0.033mmol) を加えて

凍結乾燥し、目的物（34mg）を得た。

[0745] 実施例 56 : [N3 - PEG (3)] - MSG1 - 0x

[化 180]



(上記の図において、構造式の右の模式図は、実施例 60、61、62、63、64、65、66の反応式に表示されるアジド基が導入されたリンカー構造を有する中間体の模式図中の対応構造を示す。)

[0746] 工程 1 : (MSG1_) Asn

市販品である monosialo-Asn free (1S2G/ 1G2S- 10NC-Asn、(株)糖鎖工学研究所製) (「(MSG—) Asnj」と呼ぶ) (500mg) を以下の条件で逆相 HPLC 分離精製し、1st main peak として溶出される (MSG1_) Asn (保持時間 15～19 min 付近) と 2nd main peak として溶出される (MSG2_) Asn (保持時間 21～26 min 付近) に分離した。0.1% ぎ酸水溶液を溶離液として使用し、装置には ELS—PDA トリガー分取システム (日本分光株式会社製) を使用し、カラムには Inertsil ODS—3 (10um、30Φx250mm、GLサイエンス社製) を使用し、流速を 30mL/min とした。溶出中に UV 検出 (210nm) された最初のピークに帰属するフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、目的物 (238mg) を得た。

[0747] 工程 2 : MSG1

上記工程 1 で得られた化合物 (229mg) を 200mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.25) (1145μl) に溶解させ、EndoM (東京化成工業 (株) 製、1U/mL) 水溶液

(100 μ L) を加え、35℃で6日間インキュベートした。反応終了後、反応液を VIVASPIN 15R (Hydrosart 膜、30K, 6,000 g) を用いて限外ろ過し、得られた通過液を逆相 HPLC 分離精製した。0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を溶離液として使用し、装置には ELS-PDA トリガー分取システム (日本分光株式会社製)、カラムには Inertsil ODS-3 (GLサイエンス社製) を使用した。溶出中に UV 検出 (210nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥し、目的物 (117mg) を得た。

[0748] 工程 3 : [N₃-PEG (3)] -MSG1

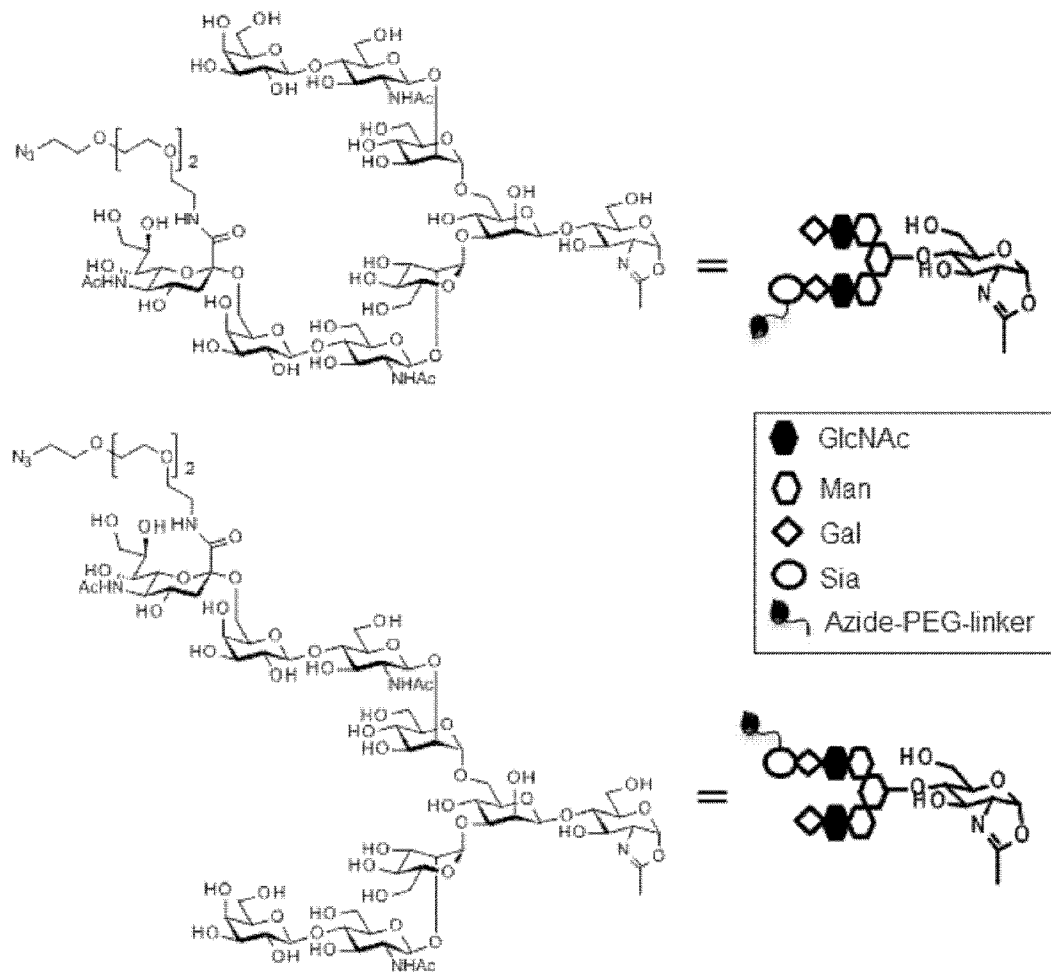
上記工程 2 で合成した化合物 (169mg) を、実施例 55 工程 1 と同様に反応させ、目的物 (94.2mg) を得た。

[0749] 工程 4 : [N₃-PEG (3)] -MSG1 -Ox

上記工程 3 にて合成した化合物 (100mg) を、実施例 55 工程 2 と同様に反応させ、目的物 (89mg) を得た。

[0750] 実施例 57 : [N₃-PEG (3)] -MSG -Ox

[化 18 1]



(上記の図において、構造式の右の模式図は、実施例 59 の反応式に表示されるアジド基が導入されたリンカー構造を有する中間体の模式図中の対応構造を示す。)

[0751] 工程 1 : (MSG -) Asn の調製

市販品である 1S2G/ 1G2S — 10NC — Asn — Fmoc ((株) 糖鎖工学研究所製) (「Fmoc - (MSG -) Asn 」と呼ぶ) (1000mg) をエタノール / 水 (1 / 1) (10 mL) に溶解させ、1規定の水酸化ナトリウム水溶液 (1.75mL , 4 当量) を加え、室温で 3 時間撹拌した。反応終了後、反応液をアミコンウルトラ (30K、ミリポア社製) を用いて限外ろ過し、固形物を除去し、得られた通過液に 1N 塩酸 (832 μ L 1.9 当量) 加えた。高速濃縮装置 V_10 (Biotage 社製) を用いて、溶媒を除去した。アセトニトリルを加えて、高速濃縮装置 V_10 (Biotag

e社製)を用いて、溶媒を除去した後に、逆相HPLC分離精製した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置にはPurif_Rp2(昭光サイエンティフィック製)を使用し、カラムにはInertsil ODS-3(GLサイエンス製)を使用した。溶出中にUV検出(220nm)された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥した。再び、純水に溶解させると、pH試験紙で酸性であることが確認されたので、18%アンモニア水(150 μ l)を加え、pH試験紙で塩基性になったことを確認し、再び凍結乾燥した。得られた目的物(840mg)をそのまま次の反応に用いた。

[0752] 工程2:MSGの合成

工程1にて得られた化合物(840mg)を200mMリン酸緩衝溶液(pH6.25)(6000 μ l)に溶解させ、EndoM(東京化成工業(株)製、1U/ml)水溶液(200 μ l)を加え、28℃で26時間インキュベートした。反応が完了していないため、EndoM(東京化成工業(株)製、1U/ml)水溶液(50 μ l)を加え、28℃で2時間インキュベートした後に、反応が完了するまで室温で放置した。反応終了後、反応液をアミコンウルトラ(30K、ミリポア社製)を用いて限外ろ過した。得られた通過液にトリフルオロ酢酸(80 μ l)を加え、逆相HPLC分離精製した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置にはPurif_Rp2(昭光サイエンティフィック製)を使用し、カラムにはInertsil ODS-3(GLサイエンス製)を使用した。溶出中にUV検出(220nm)された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥した。残留トリフルオロ酢酸を除く目的で、再度純水に溶解させ、目的化合物(618mg)を無色固体として得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{66}H_{110}N_4O_{49}$: [M+H]⁺ 1743.62, Found 1743.63

[0753] 工程3:[N₃-PEG(3)]-MSGの合成

上記工程2にて得られた化合物(120mg)を用いて、工程55工程1と同様の手法に従って、目的物(88.6mg)を得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{73}H_{124}N_8O_{51}$: [M+2H]²⁺ 965.37, Found 965.37

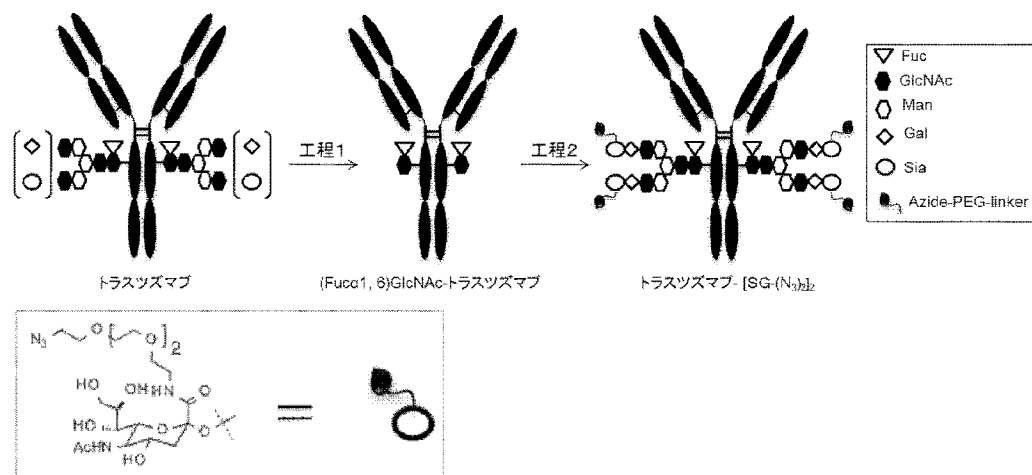
[0754] 工程4 [N₃-PEG (3)] - MSG - Ox の合成

上記工程4にて得られた合成した化合物 (100mg) を用いて、工程5工程2と同様の手法に従って、目的物 (88mg) を得た。

[0755] 糖鎖リモデリング抗体の調製)

実施例58：糖鎖変換1 (T-SG)

[化182]



(上記式は、SG型N297糖鎖の非還元末端シアル酸にアジド基が導入されたリンカー構造を示す。実施例58において、N297糖鎖にアジド基を導入した中間体のリンカー構造は全て上記式と同一の構造である。)

[0756] 工程1：(Fucα1, 6)GlcNAc-Trastuzumab の調製

参考例3で調製したTrastuzumab溶液22mg/mLの(25mMヒスチジン溶液(pH6.0)、5%ソルビトール溶液)(45.5mL)を共通操作Cを用いて、50mMリン酸緩衝液(pH6.0)への緩衝液交換を二回に分けて行った。得られた28.1mg/mLのTrastuzumab溶液(50mMリン酸緩衝液(pH6.0))(18mL)と28.0mg/mLの同溶液(18mL)に、2.0mg/mL野生型EndoS溶液(PBS)をそれぞれ1.26mL、1.27mL加え、37℃で4時間インキュベートした。反応の進行具合をExperion電気泳動ステーション(BIO-RAD製)を用いて確認した。反応終了後、以下の方法に従い、アフィニティークロマトグラフィーによる精製とヒドロキシアパタイトカラムによる精製を行った。

(1) アフィニティークロマトグラフィーによる精製

精製装置 : AKTA pure150 (GE ヘルスケア製)

カラム : HiTrap rProtein A FF (5mL) (GE ヘルスケア製)

流速 : 5mL/min (チャージ時は 1.25mL/min)

上記で得た反応液を複数回に分けて精製した。カラムは2連結し、カラムへの結合時は、反応液をカラム上部へ添加し、結合バッファー (20mM リン酸緩衝液 (pH6.0)) を 1.25mL/min で 2CV 流し、更に 5mL/min で 5CV 流した。中間洗浄時は、洗浄溶液 (20mM リン酸緩衝液 (pH7.0)、0.5M 塩化ナトリウム溶液) を 15CV 流した。溶出時は、溶出バッファー (ImmunoPure IgG Eutition buffer、PIERCE 製) を 6CV 流した。溶出液を 1M トリス緩衝液 (pH9.0) で直ちに中和した。溶出中に UV 検出 (280nm) されたフラクションについて、微量分光光度計 Xpose (Trinean 製)、及び Experion 電気泳動ステーション (BIO-RAD 製) を用いて確認した。目的物を含むフラクションを共通操作 C を用いて、5mM リン酸緩衝液 50mM2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES) 溶液 (pH6.8) への緩衝液交換を行った。

(2) ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製

精製装置 : AKTA avant25 (GE ヘルスケア製)

カラム : Bio-Scale Mini CHT Type I カートリッジ (5mL) (BIO-RAD 製)

流速 : 5mL/min (チャージ時は 1.25mL/min)

カラムを2連結し、上記 (1) で得られた溶液を複数回に分けて精製した。溶液をカラムの上部へ添加し、A液 (5mM リン酸緩衝液、50mM2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES) 溶液 (pH6.8)) を 1.25mL/min で 2CV 流し、更に 5mL/min で 3CV 流した。その後、A液とB液 (5mM リン酸緩衝液 50mM2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES) 溶液 (pH6.8)、2M 塩化ナトリウム溶液) を用いて、溶出した。溶出条件は、A液 : B液 = 100 : 0 ~ 0 : 100 (15CV) である。さらに、洗浄溶液 (500mM リン酸緩衝液 (pH6.5)) を 5CV 流した。

目的物を含むフラクションを共通操作 C を用いて緩衝液交換を行い、25.5mg/mL の (Fuc α 1,6) GLcNAc- α -Trastuzumab 溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6.0

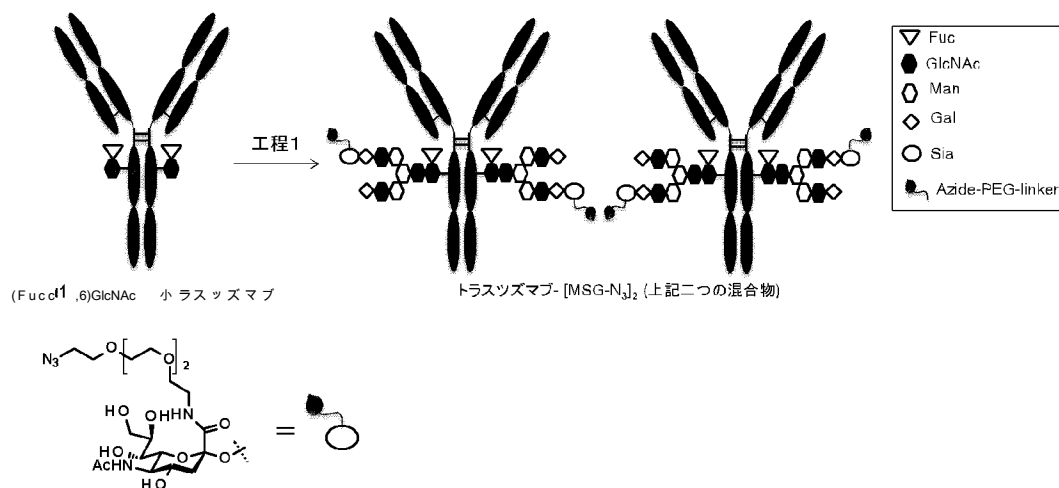
)) (35m い を得た。

[0757] 工程 2 : Trastuzumab [SG - (N₃)₂]₂ の調製

上記工程1にて得られた23.9mg/mL (Fuc α 1, 6) GlcNAc - Trastuzumab 溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6.0)) (3.37mL) に、実施例55工程2で合成した化合物 (2.9mg) の50mM リン酸緩衝液 (pH6.0) 溶液 (0.258mL) 、 4.90mg/mL の EndoS D233Q/Q303L 溶液 (PBS) (0.328mL) を加えて、30℃ で4.5時間インキュベートした。以上の操作を2ロット行った。反応の進行具合をExperiion電気泳動ステーション (Bio-RAD製) を用いて確認した。反応終了後、上記工程1と同様にアフィニティークロマトグラフィーによる精製とハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製を行った後、目的物を含むフラクションを共通操作Cを用いてリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) へ緩衝液交換を行い、10.0mg/mL の Trastuzumab [SG - (N₃)₂]₂ 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0)) (15.5mL) を得た。

[0758] 實施例 59 : 糖鎖變換 2 (T - MSG)

[化 183]



(上記式は、MSG型 N297 糖鎖の非還元末端シアル酸にアジド基が導入されたリンカー構造を示す。実施例 59 において、N297 糖鎖にアジド基を導入した中間体のリンカー構造は全て上記式と同一の構造である。)

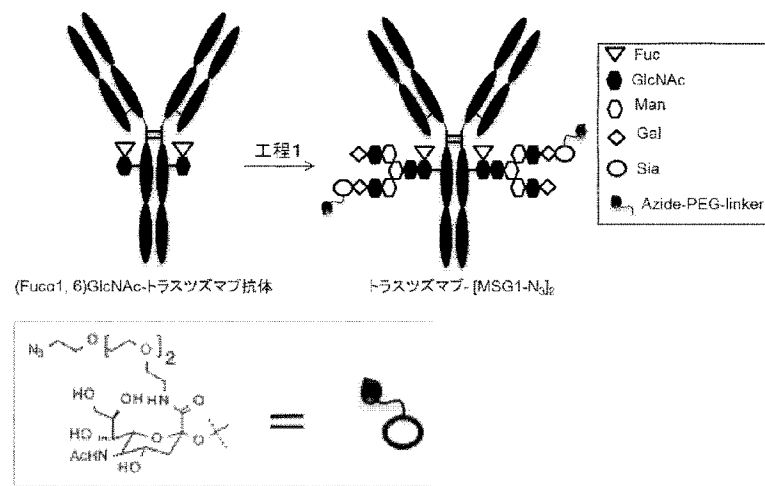
[0759] 工程 1 : Trastuzumab [MSG - N₃]₂

以下の操作を5ロット行った。実施例58工程1にて得られた化合物 (20mg/m

L, 15.0mL) を用いて、実施例 57 工程 4 にて得られた化合物 (25.5mg) を糖鎖供与体として使い、30℃で3時間インキュベートし、実施例 59 工程 2 と同様の操作を行った。5ロット合わせて、14.4mg/mL Trastuzumab [MSG - N₃]₂ 溶液 (りん酸緩衝生理食塩水 (pH6.0)) (93.5mL) を得た。

[0760] 実施例 60 : 糖鎖変換 3 (T-MSG1)

[化 184]



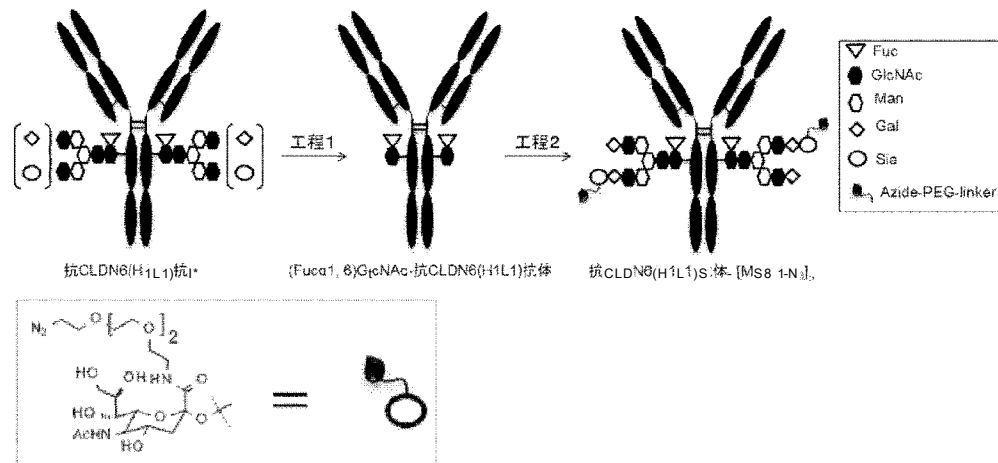
(上記式は、MSG1型 N297 糖鎖の非還元末端シアル酸にアジド基が導入されたリンカー構造を示す。実施例 60 において、N297 糖鎖にアジド基を導入した中間体のリンカー構造は全て上記式と同一の構造である。実施例 61-66 も同様である。)

工程 1 : Trastuzumab [MSG1 - N₃]₂

以下の操作を2ロット行った。実施例 58 工程 1 で得られた化合物 (25.5mL, 7.8mL) を用いて、実施例 56 工程 4 にて得られた化合物 (25.5mg) を糖鎖供与体として使い、30℃で3時間インキュベートし、実施例 59 工程 2 と同様の操作を行った。2ロット合わせて、10.6mg/mL Trastuzumab [MSG1 - N₃]₂ 溶液 (りん酸緩衝生理食塩水 (pH6.0)) (31mL) を得た。

[0761] 実施例 61 : 糖鎖変換 4 (CLDN6 - MSG1 (H1L1))

[化 185]



工程 1 : (Fucal, 6) GLcNAc - 抗 CLDN6 抗体 (H1L1)

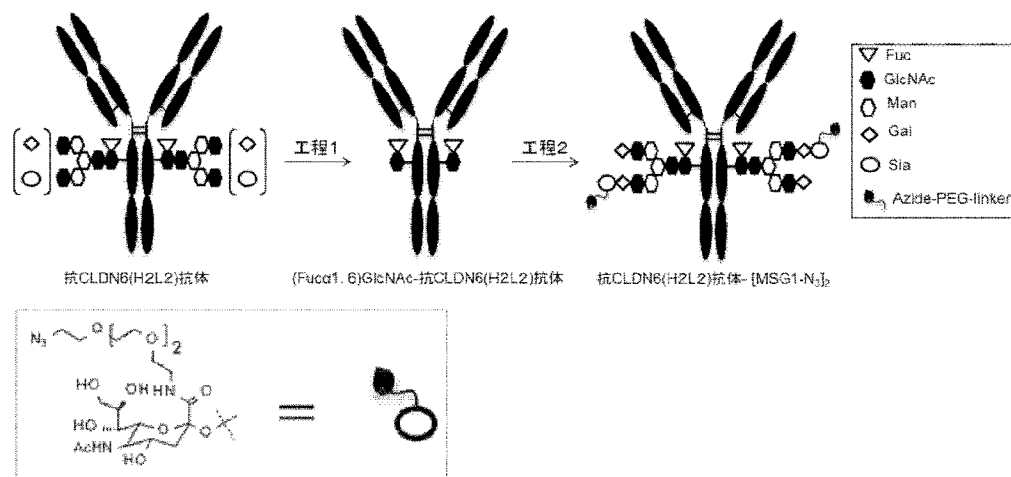
実施例 136 で調製した抗 CLDN6 抗体溶液 ca. 37.7mg/mL (25mM ヒスチジン溶
液 (pH6.0)、5% ソルビトール溶液) (2.5mL) を用いて、実施例 58 工程 1
と同様の操作を行い、19.2mg/mL の (Fucal, 6) GLcNAc - 抗 CLDN6 抗体 (H1
L1) 溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6.0)) (4.8mL) を得た。

[0762] 工程 2 : 抗 CLDN6 抗体 (H1L1) - [MSG 1 - N₃]₂

上記工程 1 で得られた 19. 2mg/mL (Fucal, 6) GLcNAc - 抗 CLDN6 (H1L1) 抗体溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6. 0)) (4. 8mL) を用いて、実施例 60 工程 1 と同様の操作を行うことによって、10. 2mg/mL 抗 CLDN6 抗体 (H1L1) - [MSG1-N₃]₂ 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0)) (7. 2mL) を得た。

[0763] 實施例 62 : 糖鎖變換 5 (CLDN6 - MSG 1 (H2L2))

[化 186]



工程 1 : (Fuc α 1 , 6) G LcNAc — 抗 CLDN6 抗体 (H2L2)

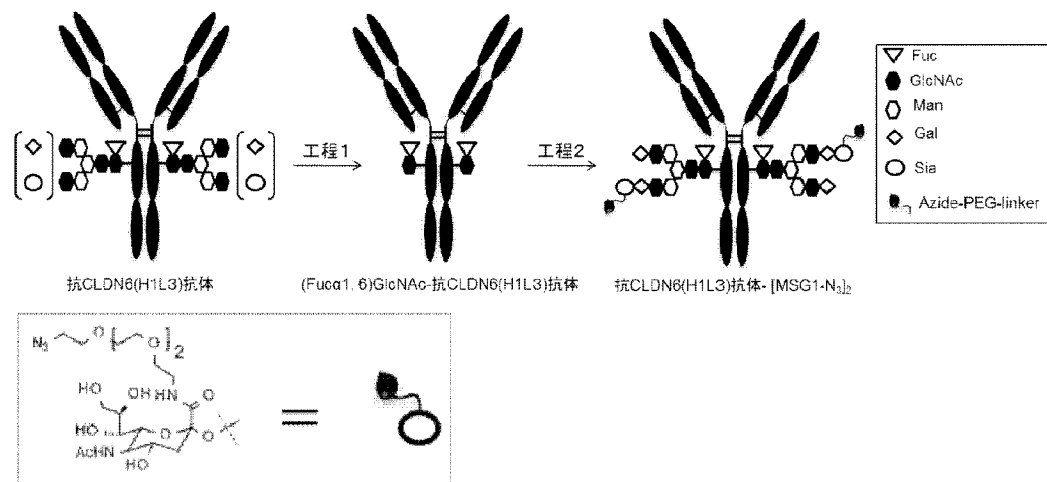
実施例 136 で調製した抗 CLDN6 抗体溶液 ca. 20mg/mL (25mM ヒスチジン溶液 (pH6. 0)、5% ソルビトール溶液) (6mL) を用いて、実施例 58 工程 1 と同様の操作を行い、21. 84mg/mL の (Fuc α 1 , 6) G LcNAc - 抗 CLDN6 抗体 (H2L2) 溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6. 0)) (5. 7mL) を得た。

[0764] 工程 2 : 抗 CLDN6 抗体 (H2L2) - [MSG 1 - N₃]₂

上記工程 1 で得られた 21. 8mg/mL (Fuc α 1 , 6) G LcNAc — 抗 CLDN6 (H2L2) 抗体溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6. 0)) (5. 7mL) を用いて、実施例 60 工程 1 と同様の操作を行うことによって、10. 2mg/mL 抗 CLDN6 抗体 (H2L2) - [MSG 1 - N₃]₂ 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0)) (11. 1mL) を得た。

[0765] 実施例 63 : 糖鎖変換 6 (CLDN6 - MSG 1 (H1L3))

[化 187]



工程 1 : (F u c α 1 , 6) G L c N A c — 抗 CLDN6 抗体 (H 1 L 3)

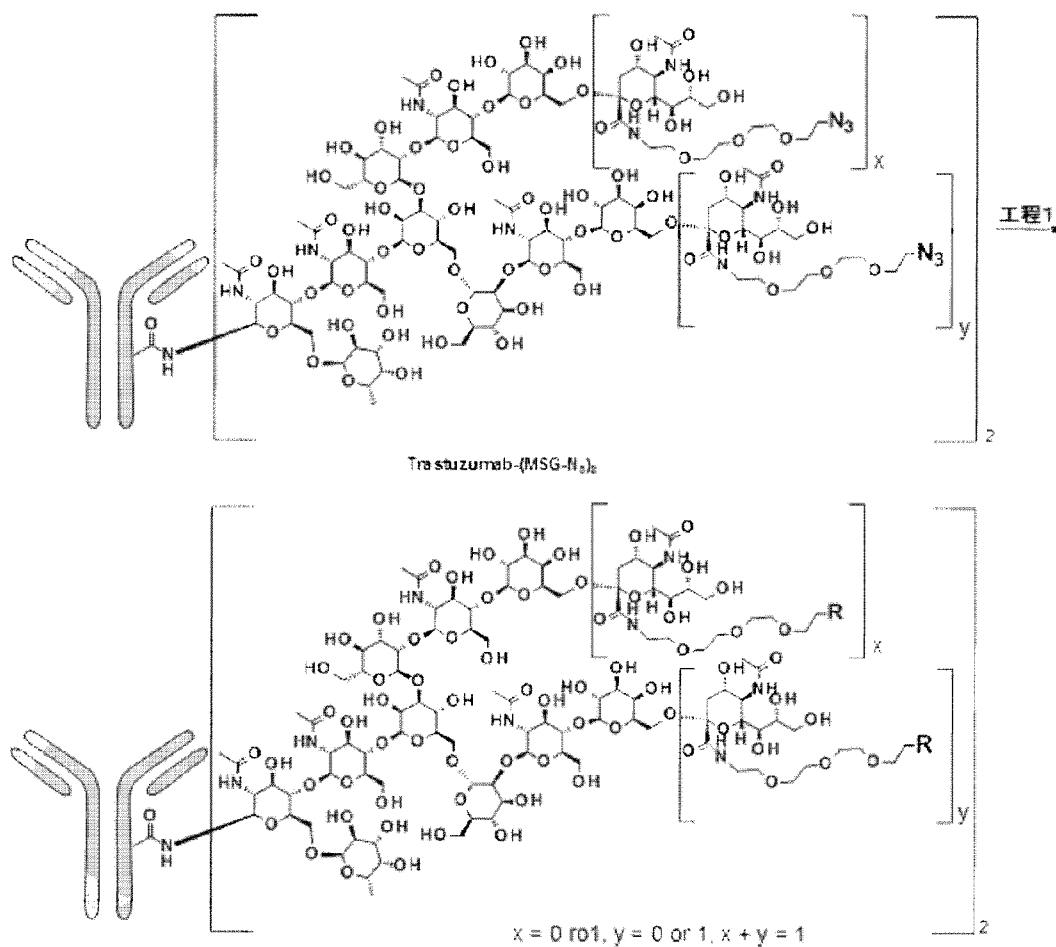
実施例 136 で調製した抗 CLDN6 抗体溶液 ca. 39. 4mg/mL (25mM ヒスチジン溶液 (pH6. 0)、5% ソルビトール溶液) (3mL) を用いて、実施例 58 工程 1 と同様の操作を行い、39. 2mg/mL の (F u c α 1 , 6) G L c N A c — 抗 CLDN6 抗体 (H 1 L 3) 溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6. 0)) (4. 5mL) を得た。

[0766] 工程 2 : 抗 CLDN6 抗体 (H 1 L 3) - [MSG 1 - N₃]₂

上記工程 1 で得られた 39. 2mg/mL (F u c α 1 , 6) G L c N A c — 抗 CLDN6 (H 1 L 3) 抗体溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6. 0)) (4. 5mL) を用いて、実施例 60 工程 1 と同様の操作を行うことによって、9. 83mg/mL 抗 CLDN6 抗体 (H 1 L 3) - [MSG 1 - N₃]₂ 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0)) (7. 2mL) を得た。

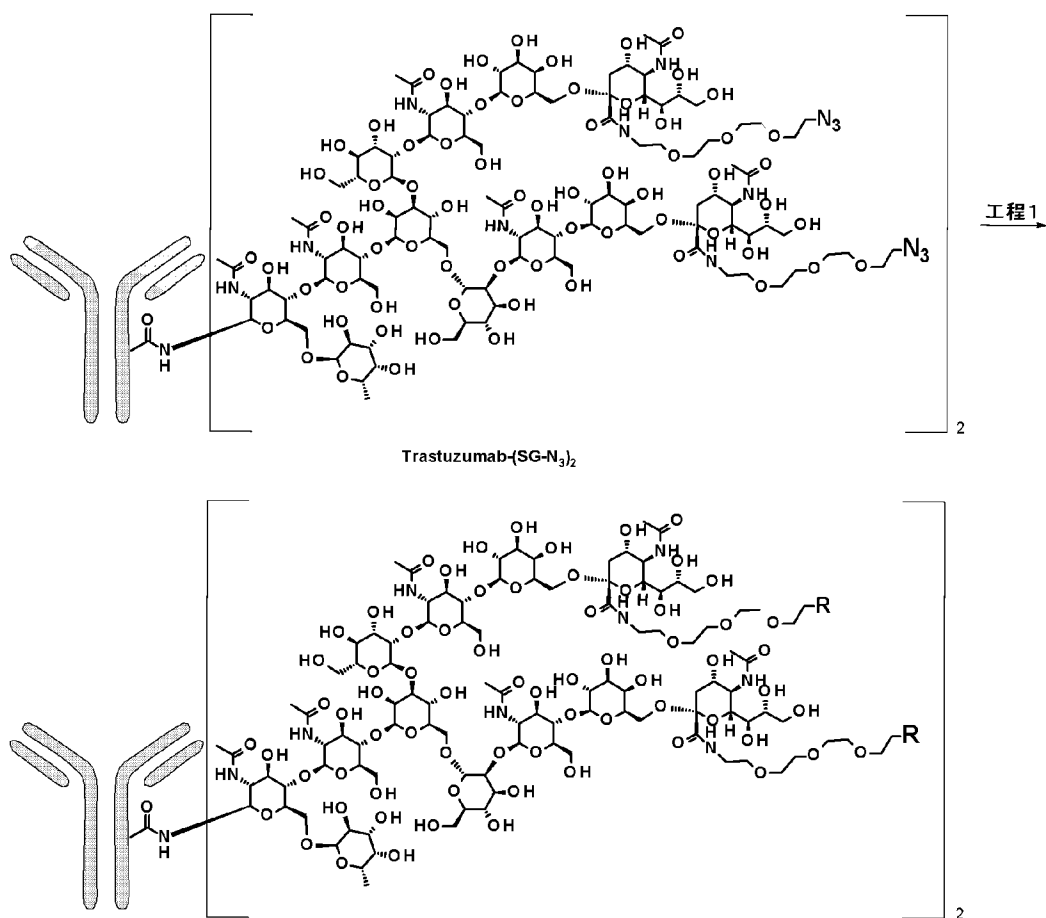
[0767] 実施例 64 : 糖鎖変換 7 (CD98 - MSG1)

[化 19 1]



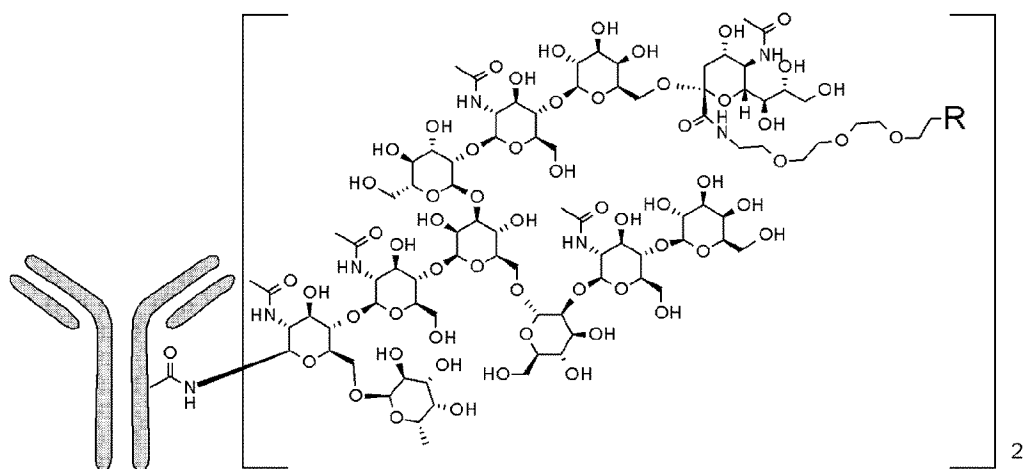
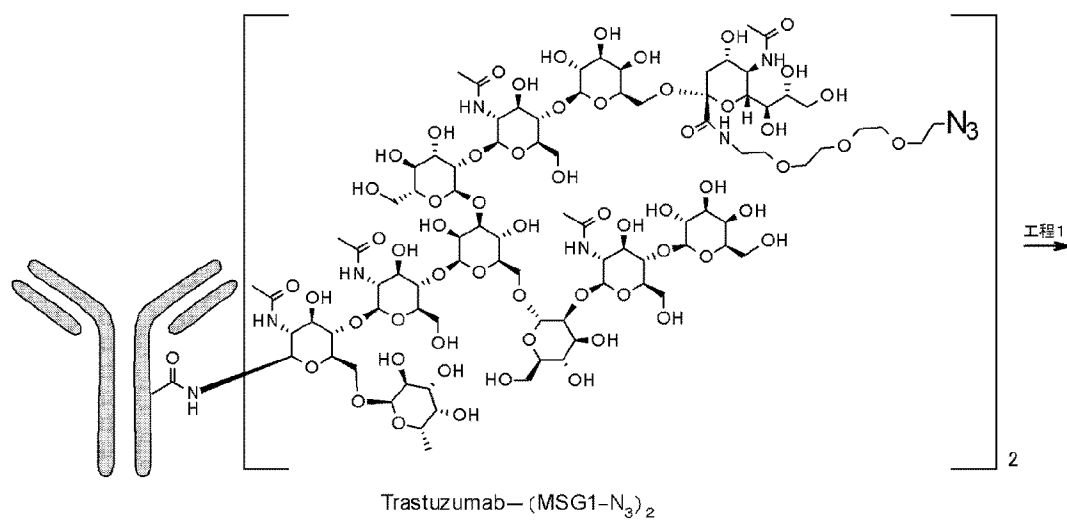
実施例 72、73、75、91に記載のADCは、下記の反応式に示すように、実施例 58工程2で得られた抗体と薬物 リンカーをコンジュゲートすることによって合成した。式中、Rは各実施例で用いられた薬物 リンカーによって異なる。

[化 192]



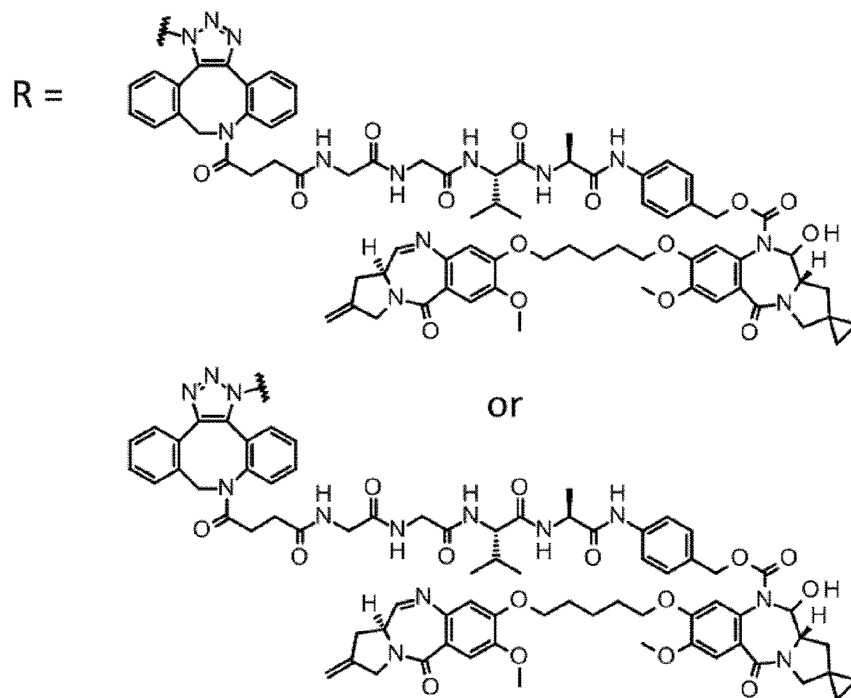
実施例 74、81、89、90、96～105、115、118 に記載の ADC は、下記の反応式に示すように実施例 60 工程 1 で得られた抗体と薬物 リンカーをコンジュゲーションすることによって合成した。、式中、R 基は各実施例で用いられた薬物 リンカーによって異なる。

[化 193]



[0774] 実施例 67 :ADC 1

[化 194]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例67工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0775] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例24工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

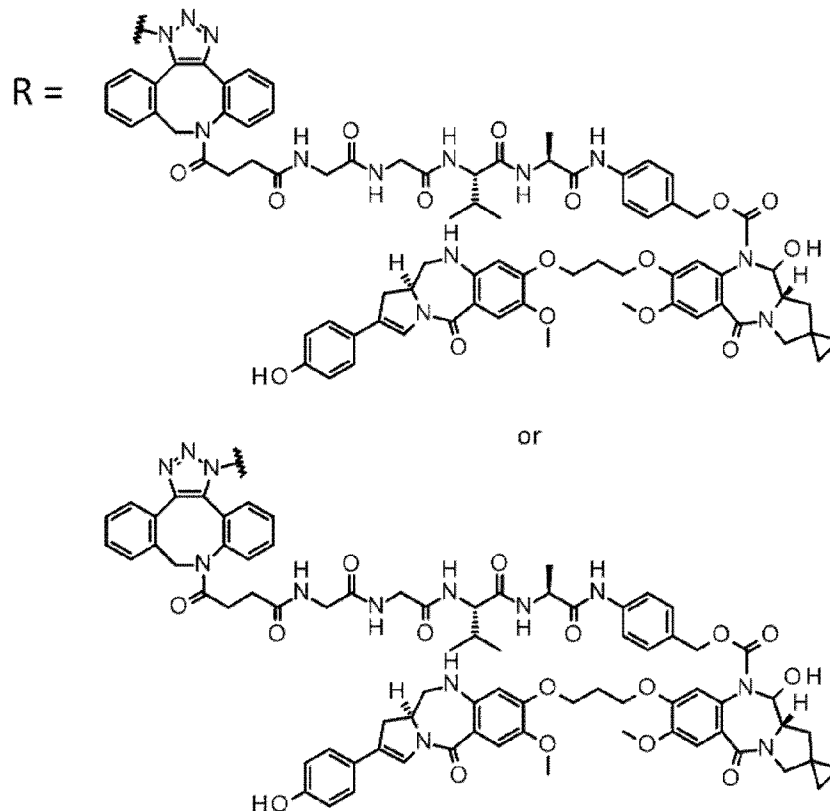
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を14.00mL得た。この溶液を共通操作Aを用いて濃縮し、目的の化合物を有する溶液を0.75mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :11.4mg/mL , 抗体収量 :8.56mg (86%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0776] 実施例68 :ADC2

[化 195]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例68工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなる リンカーを混合して保持する。)

[0777] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0) 溶液 (10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 917mL)、実施例25工程14にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (M TR- 103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6. 00mL得た。

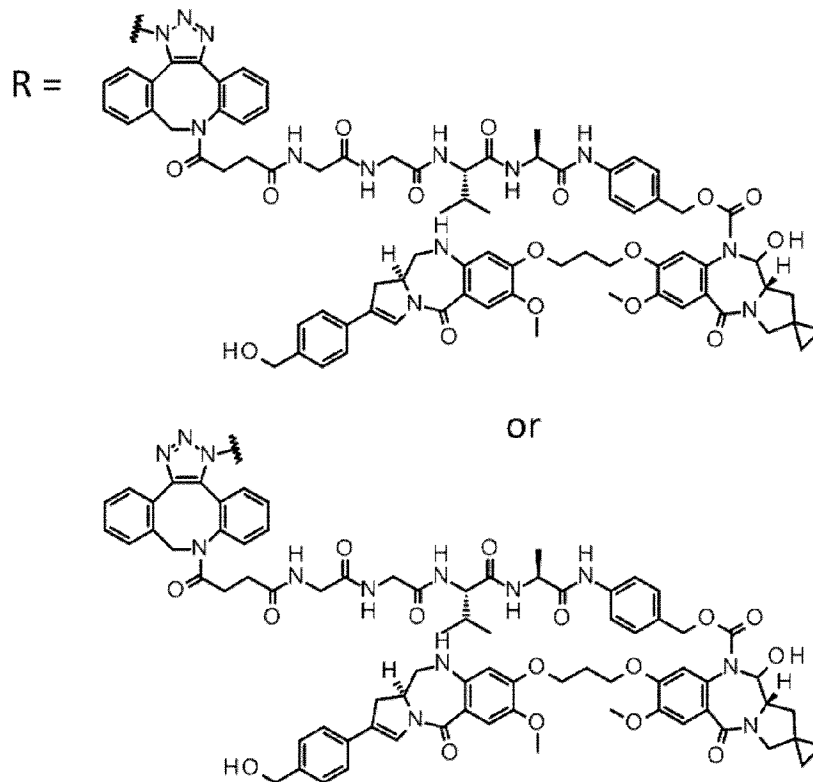
特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1. 48mg/mL , 抗体収量 :8. 88mg (89%) , 抗体一分子あたりの

抗体濃度 : 1. 45mg/mL , 抗体収量 : 8. 67mg (89%) , 抗体一分子あたりの
薬物平均結合数 (n) : 1. 9

[0780] 実施例 70 : ADC4

[化 197]



(工程 1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 70 工程 1で
得られた化合物は上記 Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合し
て保持する。)

[078 1] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 59工程 1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0) 溶液 (10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 917mL、実施例 27工程 1にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ;抗体 1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6. 00mL 得た。

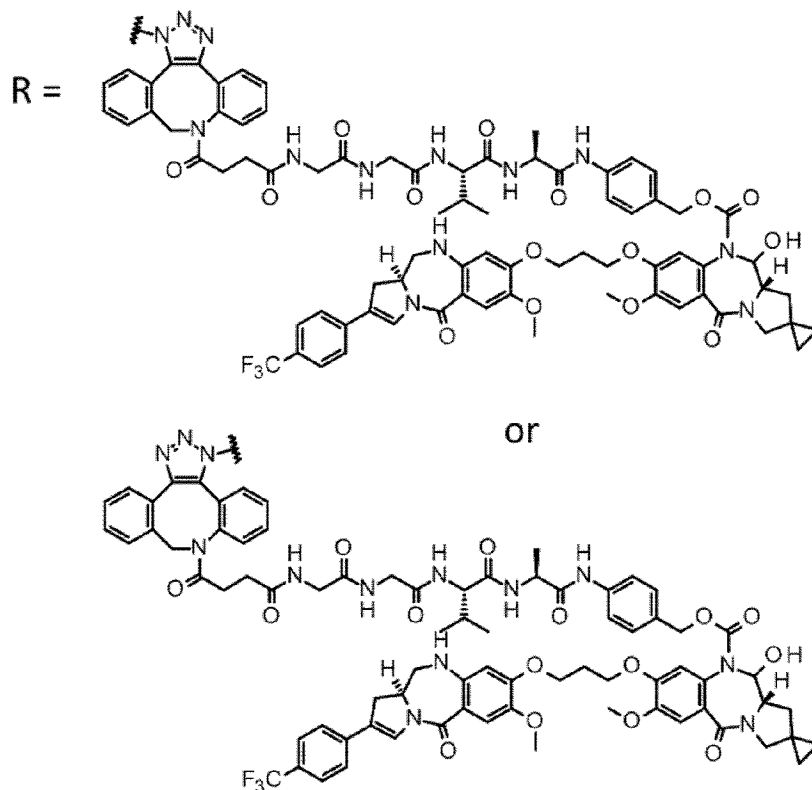
特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 30mg/mL , 抗体収量 : 7. 80mg (78%) , 抗体一分子あたりの

薬物平均結合数 (n) : 1. 9

[0782] 実施例 71 : ADC5

[化 198]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 71 工程 1 で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0783] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 59 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0) 溶液 (10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2- プロパンジオール (0. 917mL、実施例 28 工程 8 にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ; 抗体 1 分子に対して12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR- 103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48 時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する

溶液を6.00mL得た。

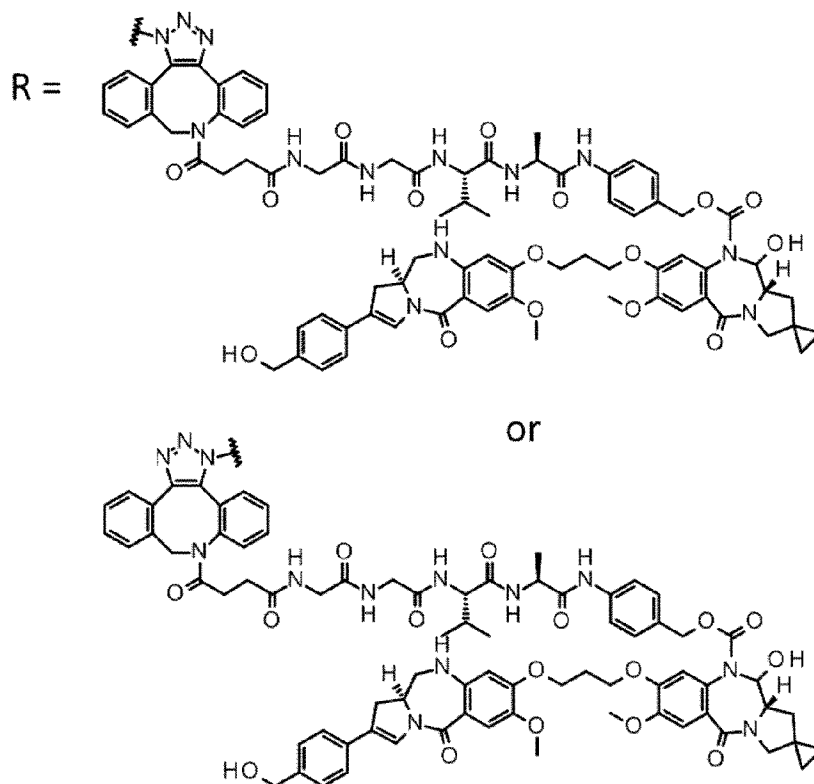
特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.08mg/mL，抗体収量：6.48mg（65%），抗体一分子あたりの

薬物平均結合数（n）：1.6

[0784] 実施例72：ADC6

[化199]



（工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例72工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。）

[0785] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例58工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）溶液（10.0mg/mL，1.00mL）に、室温にて1,2-プロパンジオール（0.835mL）、実施例27工程1にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液（0.165mL；抗体1分子に対して24当量）を加え、チューブローテーター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて、室温にて48時間反応させた。

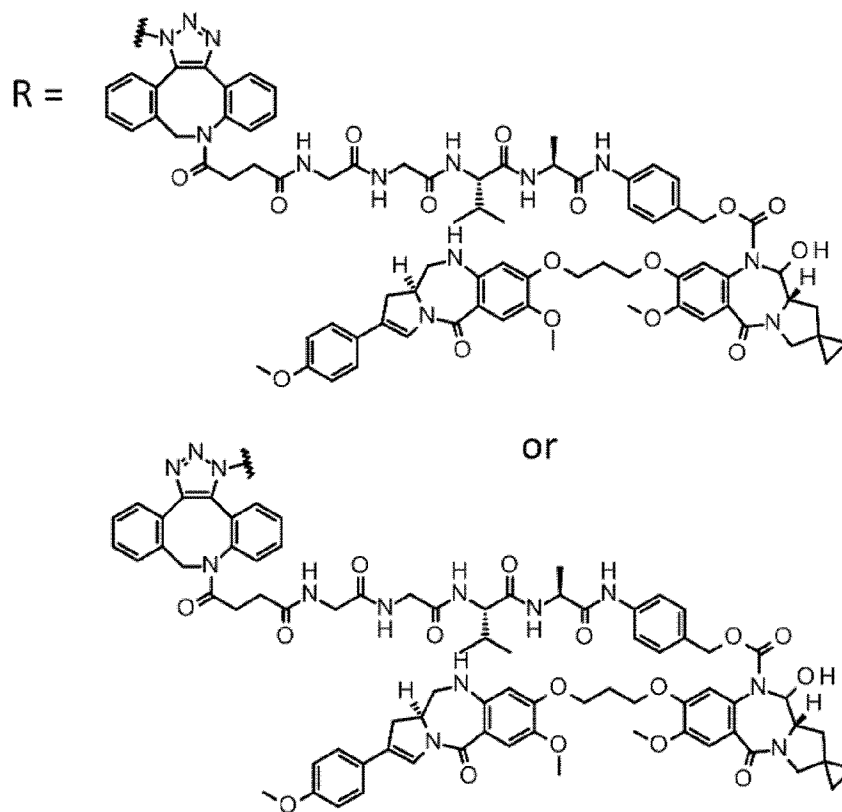
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を4.50mL得た。

特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.75mg/mL，抗体収量：7.86mg (79%)，抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：3.8

[0786] 実施例73：ADC7

[化200]



(工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例73工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0787] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例58工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL，1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.835mL)、実施例4工程12にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.165mL；抗体1分子に対して24当量) を加え、チューブローテーター (MTR

- 103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて48時間反応させた。

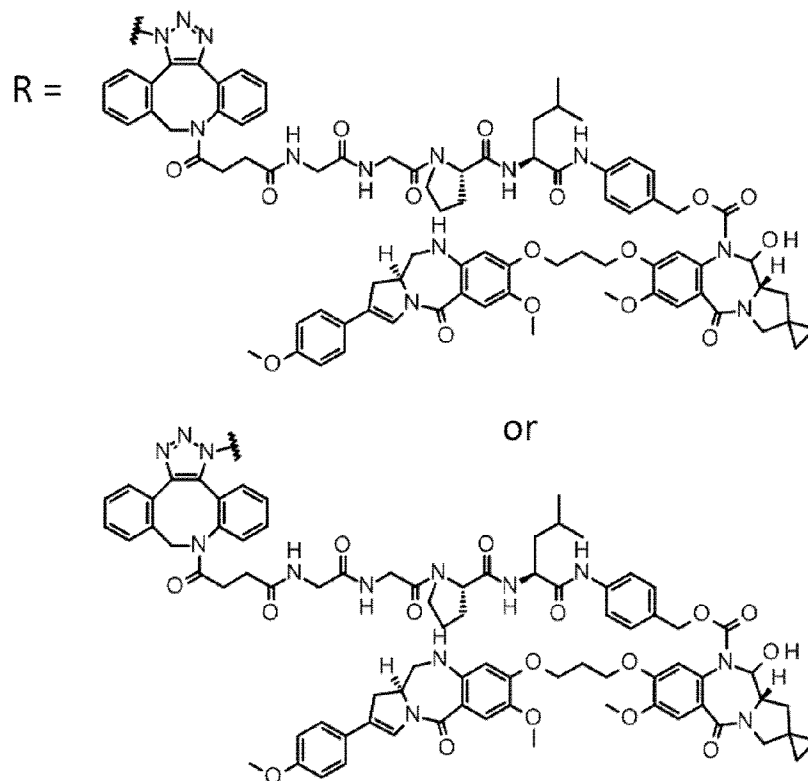
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を4.50mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.66mg/mL , 抗体収量 : 7.48mg (75%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 3.8

[0788] 実施例74 : ADC8

[化201]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例74工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0789] 工程1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL) 、実施例29工程14にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液

(0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量)を加え、チューブローター (M TR-103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて48時間反応させた。

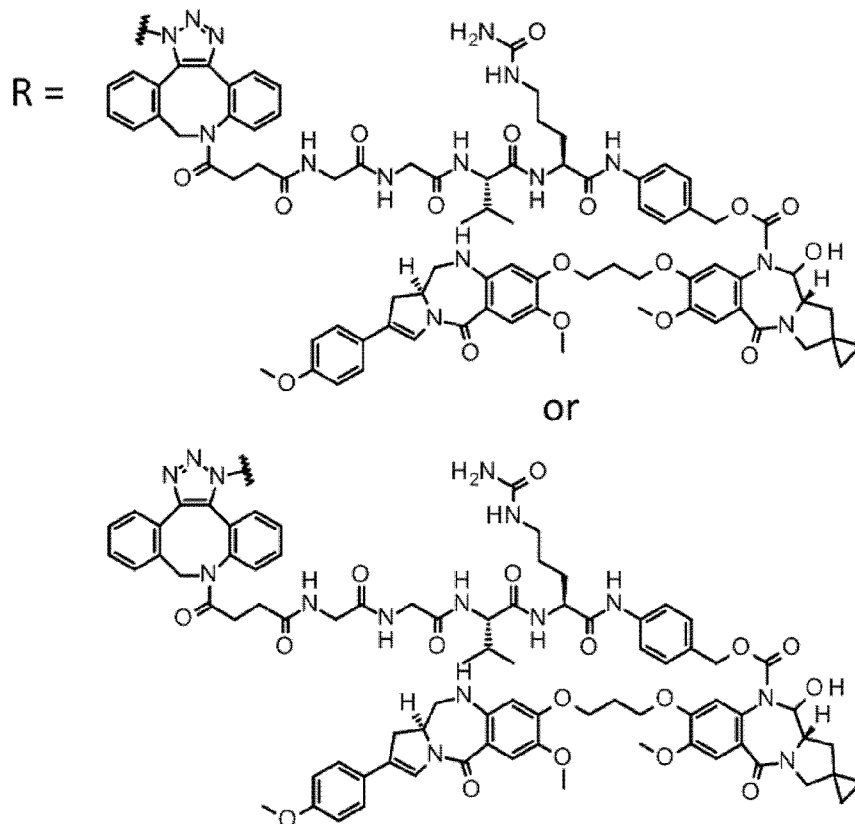
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.36mg/mL , 抗体収量 :8.17mg (82%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0790] 実施例75 :ADC9

[化202]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例75工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0791] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例58工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (

10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 835m l、実施例9工程9にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 165mL ;抗体1分子に対して24当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

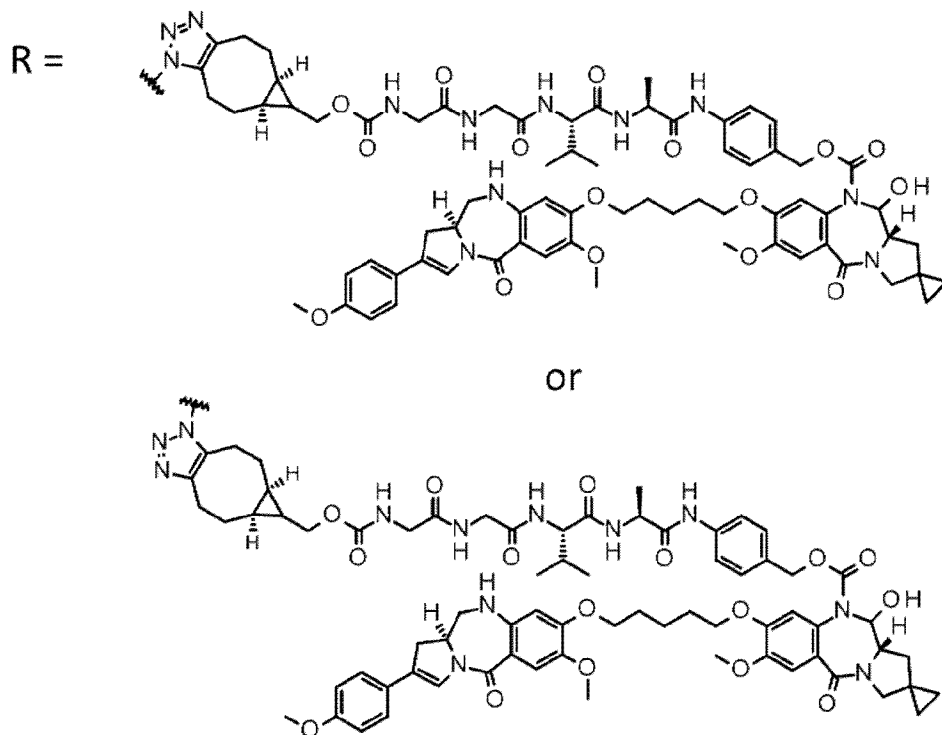
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を8. 50mL 得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 0. 86mg/mL , 抗体収量 : 7. 35mg (73%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 3. 6

[0792] 実施例76 : ADC 10

[化 203]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例76工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0793] 工程1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例106の反応式で示されるように、実施例61工程2にて得られた抗体の

リン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL, 0.400mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.200mL)、実施例30工程2にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0549mL; 抗体1分子に対して20当量)、及びジメチルスルホキシド (0.145mL) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて72時間反応させた。

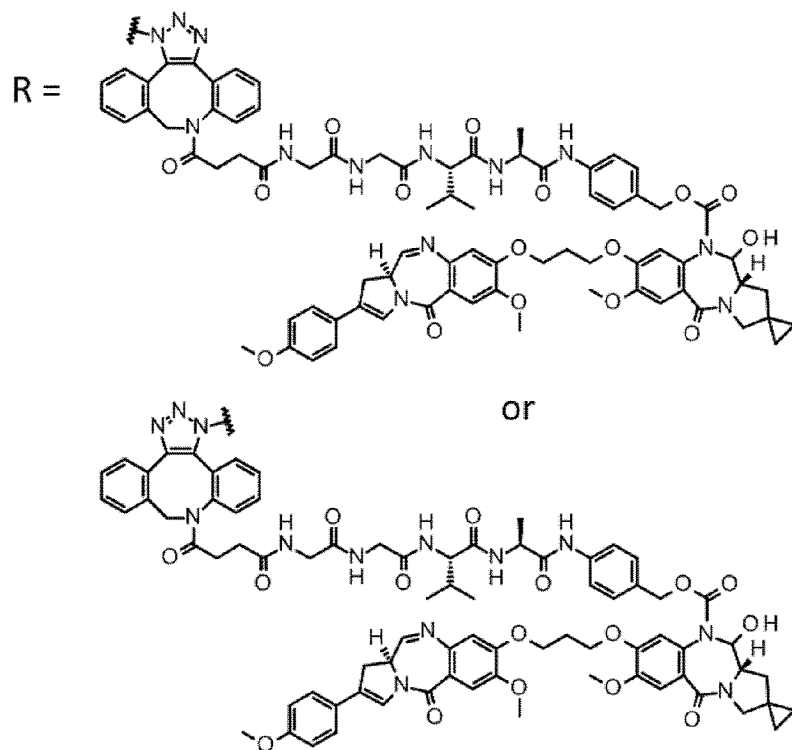
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を2.50mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.19mg/mL, 抗体収量 : 2.98mg (75%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0794] 実施例77 : ADC11

[化204]



(工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例77工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0795] 工程1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）溶液（9.88mg/mL，0.500mL）に、室温にて1,2_プロパンジオール（0.459mL）、実施例19工程12にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液（0.0408mL；抗体1分子に対して12当量）を加え、チューブローター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて、室温にて48時間反応させた。

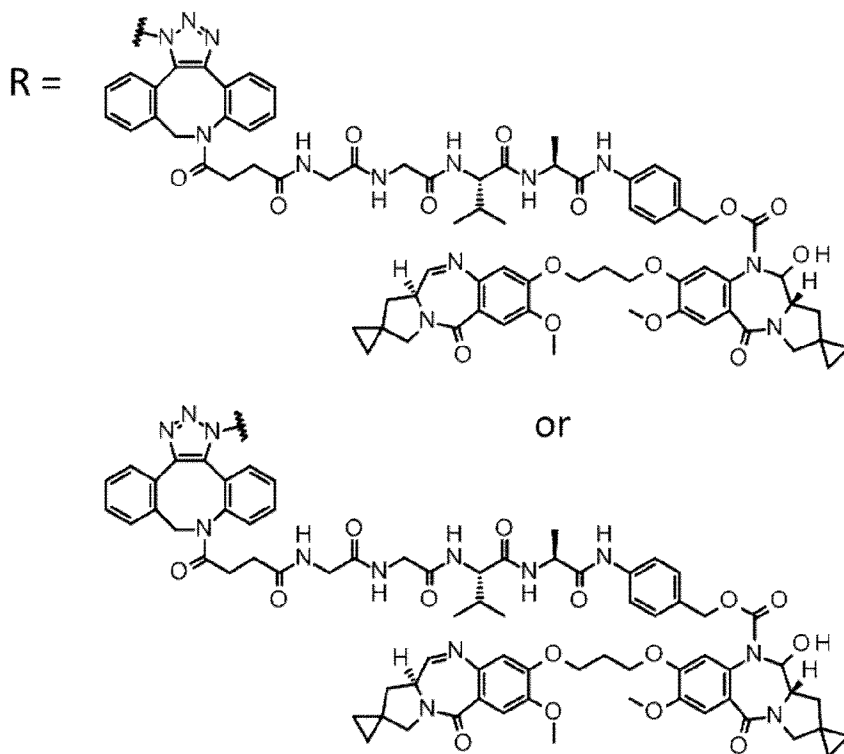
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、得られた溶液を共通操作Aを用いて濃縮し、目的の化合物を有する溶液を0.470mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特値を得た。

抗体濃度 : 8.31mg/mL , 抗体収量 : 3.90mg (79%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0796] 实施例78 :ADC 12

[化 205]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例78工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0801] 工程1:抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

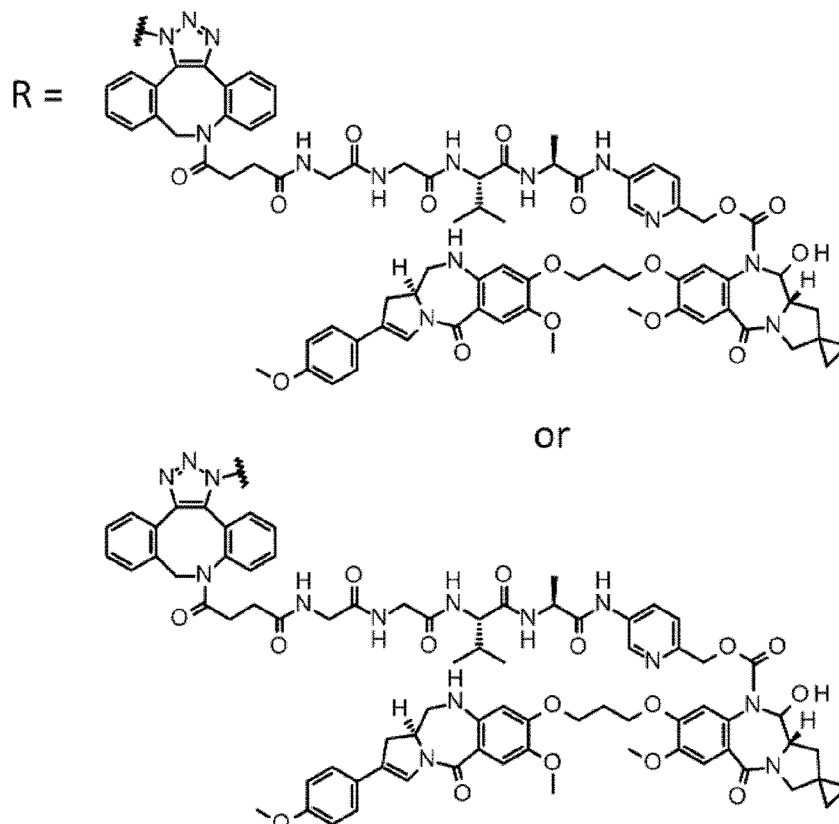
実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.917mL)、実施例22工程12にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL; 抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。
精製操作: 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

特性評価: 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度: 1.28mg/mL, 抗体収量: 7.70mg (77%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n): 1.8

[0802] 実施例81: ADC15

[化208]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例81工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0803] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例23工程10にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

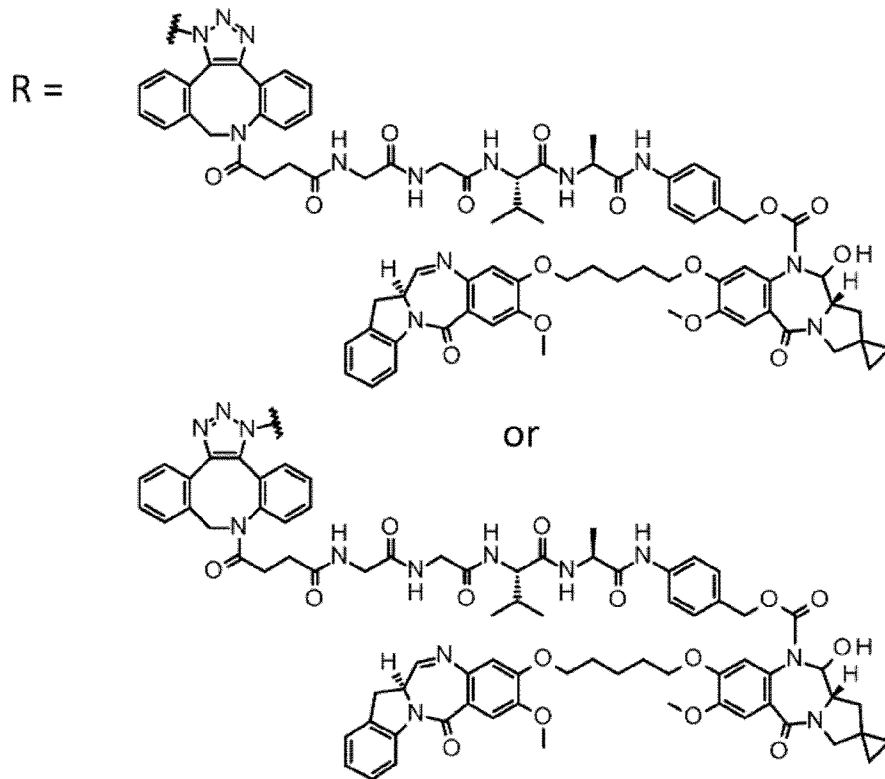
抗体濃度 :1.60mg/mL , 抗体収量 :9.60mg (96%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) :1.9

[0804] 実施例82 :ADC16

の薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0806] 实施例 83 : ADC 17

[化 2 10]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 8 3 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0807] 工程 1 :抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0) 溶液 (9. 88mg/mL , 0. 500m l に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 459mL) 、実施例35工程4にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0408mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて1日間反応させた。

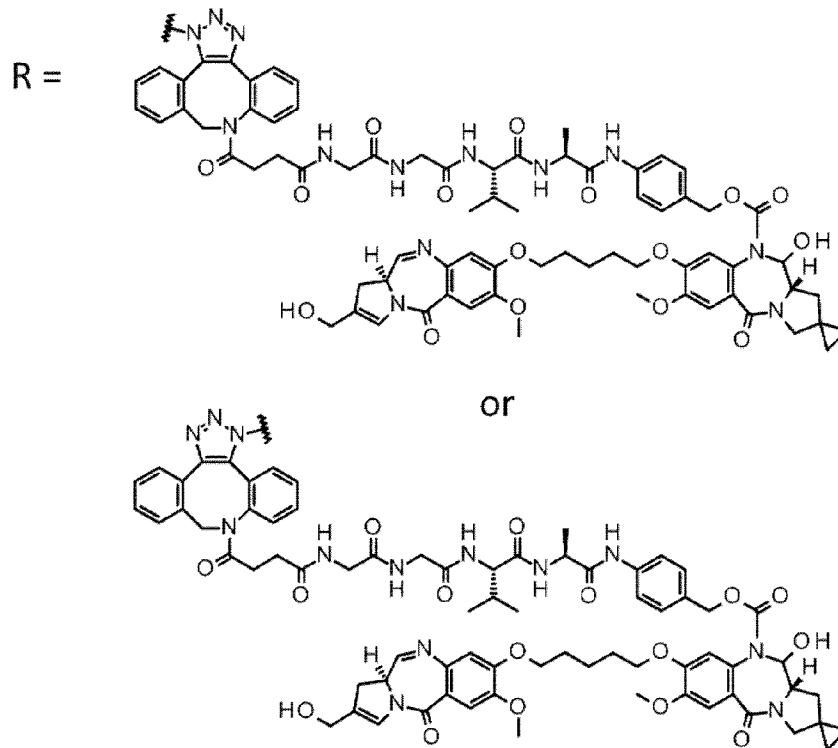
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、この溶液を共通操作Aを用いて濃縮し、目的の化合物を有する溶液を0.500mL得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 8.07mg/mL , 抗体収量 : 4.03mg (82%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0808] 実施例 84 : ADC 18

[化 211]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 86 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0809] 工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 59 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて 1,2_プロパンジオール (0.917mL、実施例 36 工程 7 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 1 日間反応させた。

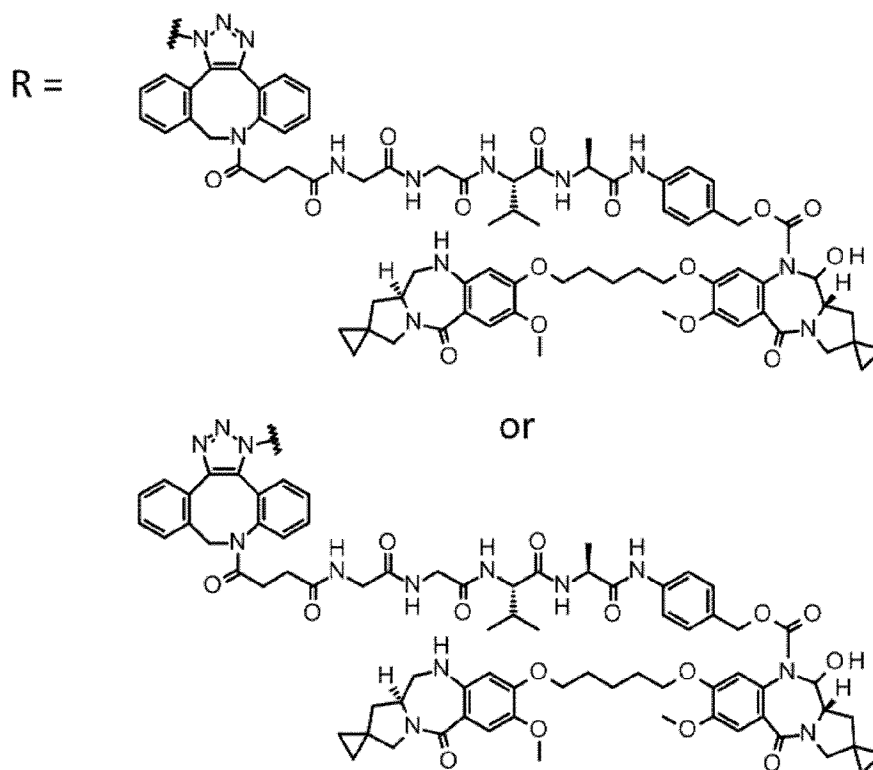
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 14.0mL 得た。この溶液を共通操作 A を用いて濃縮し、目的の化合物を有する溶液を 0.700mL 得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 12.9mg/mL, 抗体収量 : 9.00mg (90%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9

[081 0] 実施例 85 : ADC19

[化 2 12]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例85工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[081 1] 工程1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例37工程12にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ; 抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する

溶液を6.0mL得た。

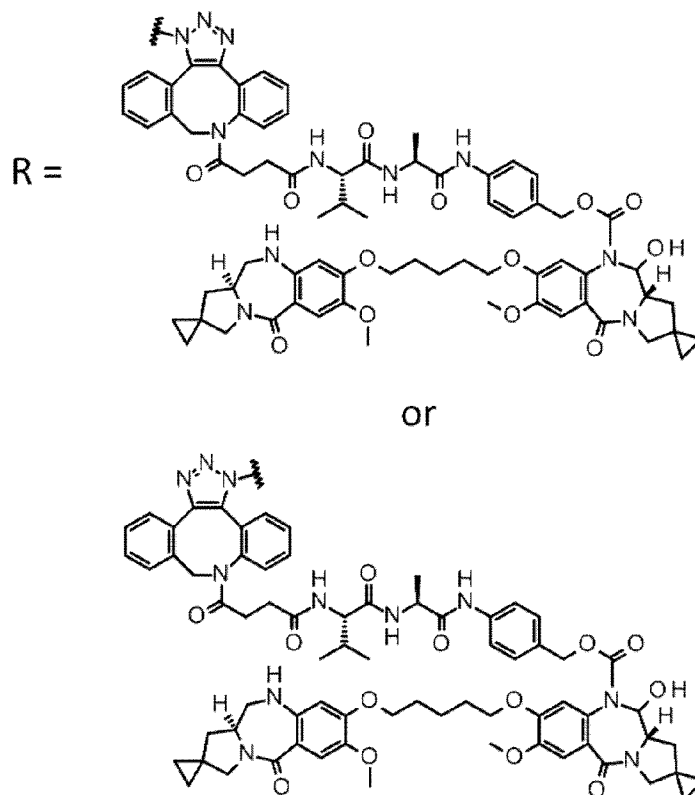
特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.33mg/mL，抗体収量：7.97mg (80%)，抗体一分子あたり

の薬物平均結合数 (n)：1.9

[0812] 実施例86：ADC20

[化213]



(工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例86工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0813] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL，1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.917mL、実施例38工程1にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL；抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

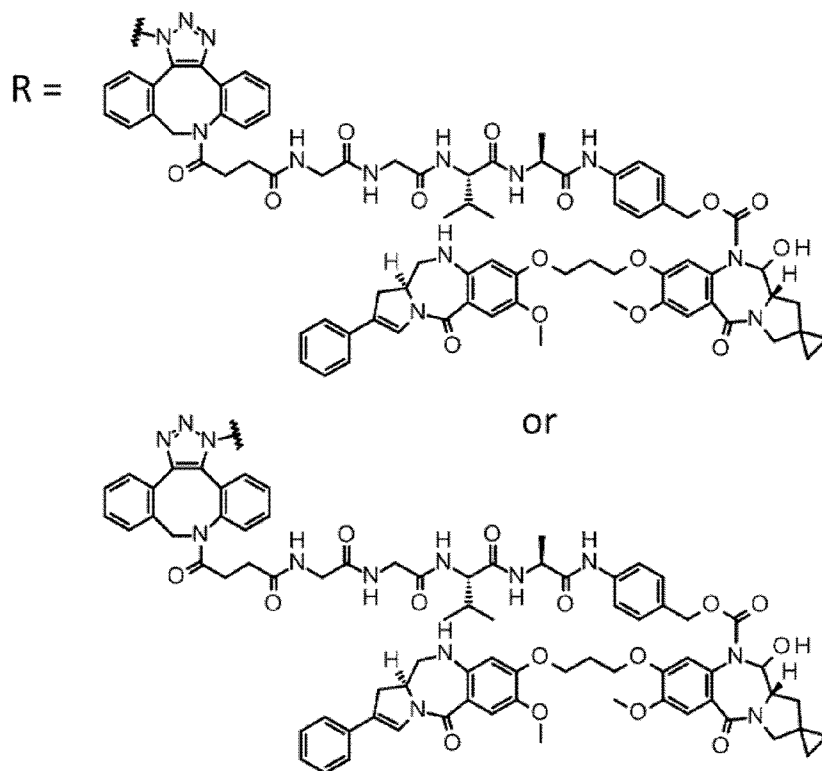
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.56mg/mL，抗体収量：9.37mg (94%)，抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：2.0

[0814] 実施例87：ADC21

[化214]



(工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例87工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0815] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL，1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.917mL)、実施例39工程6にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL；抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR

- 103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて2日間反応させた。

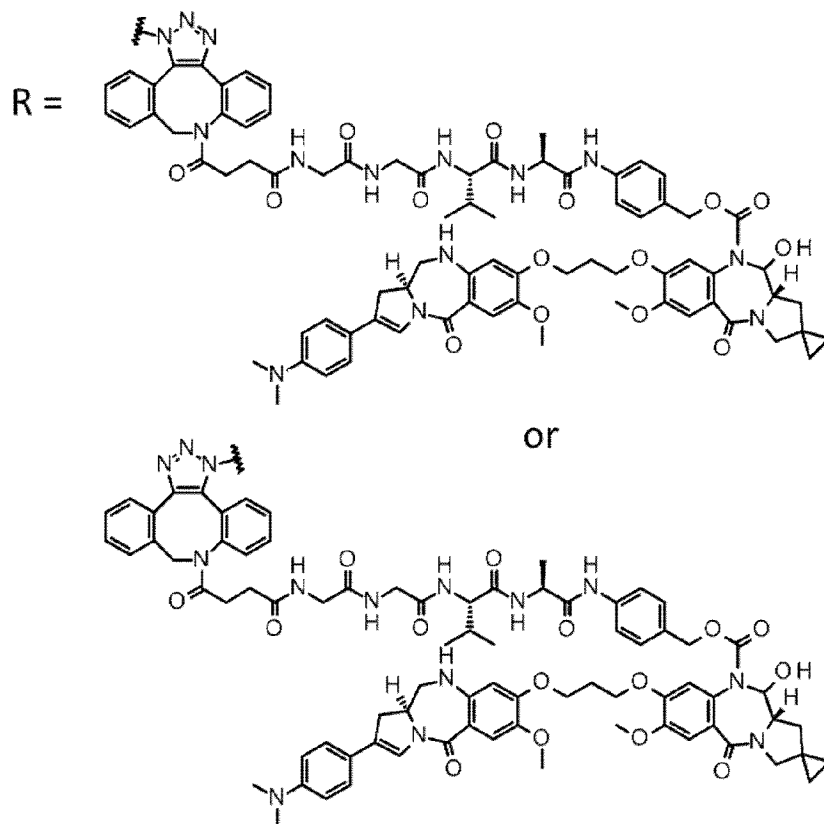
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.89mg/mL , 抗体収量 : 11.4mg (定量的) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9

[08 16] 実施例88 : ADC22

[化215]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例88で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[08 17] 工程1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)

、実施例40工程6にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液（0.0825mL；抗体1分子に対して12当量）を加え、チューブローテーター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて、室温にて2日間反応させた。

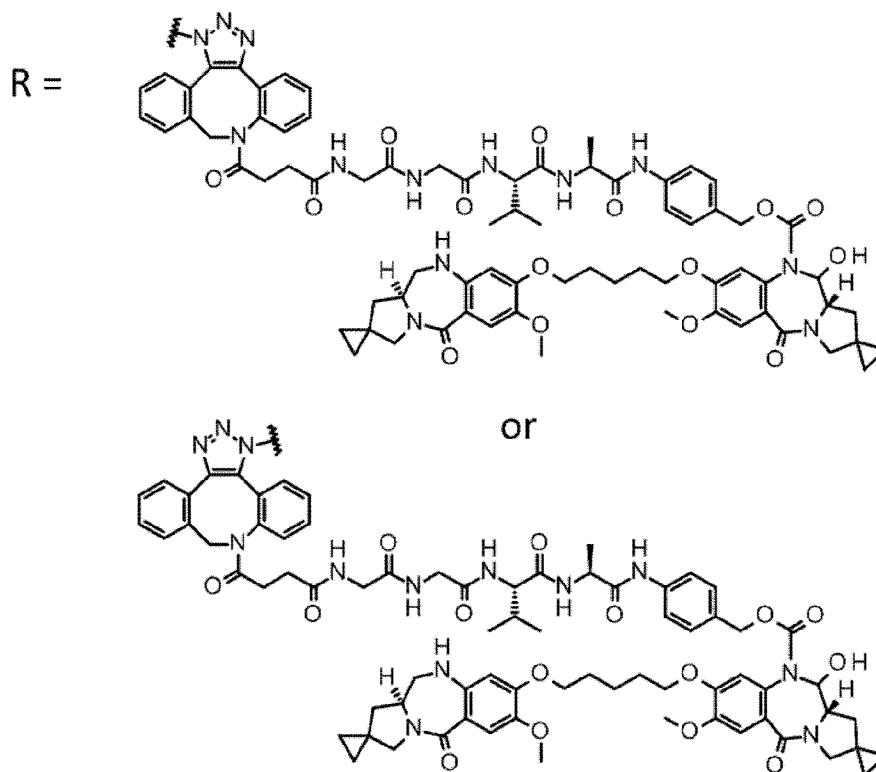
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.47mg/mL，抗体収量：8.84mg（88%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.9

[08 18] 実施例89：ADC23

[化216]



（工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例89工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。）

[08 19] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）溶液（

10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 917mL)、実施例37工程12にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (M TR- 103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

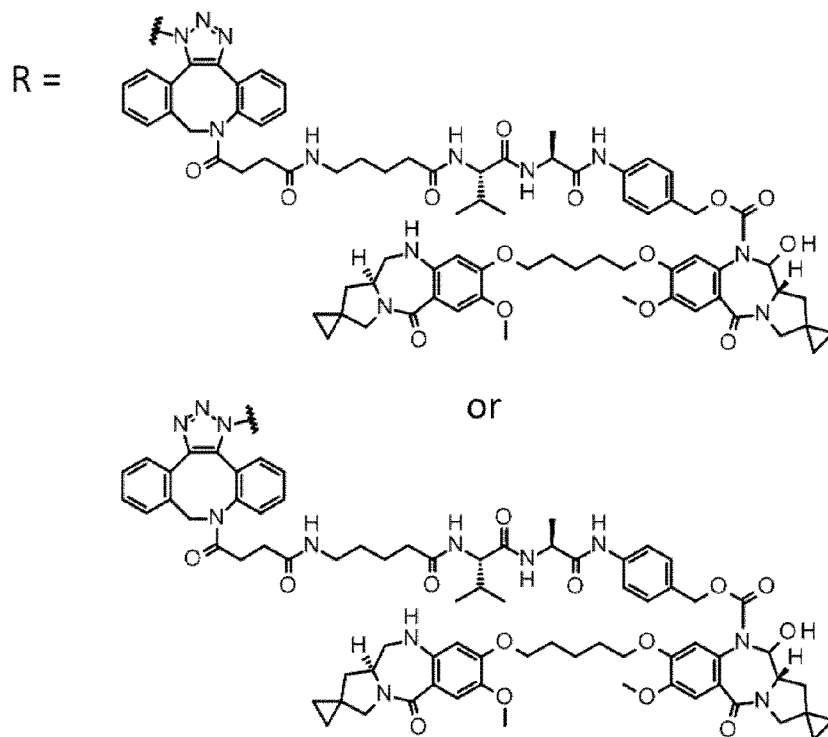
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6. 0mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1. 46mg/mL , 抗体収量 :8. 76mg (88%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1. 9

[0820] 実施例90 :ADC24

[化217]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例90工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0821] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6. 0) 溶液 (

10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 917mL
、実施例41工程2にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

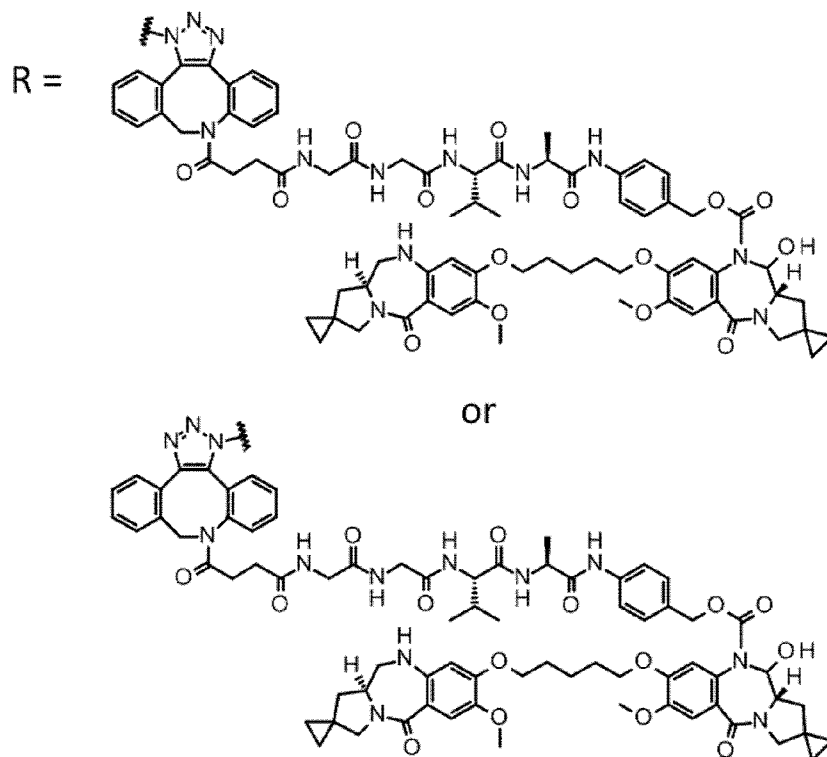
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6. 0mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1. 53mg/mL , 抗体収量 :9. 17mg (92%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) :1. 9

[0822] 実施例91 :ADC25

[化218]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例91で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0823] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例58工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.835mL)、実施例37工程12にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.165mL; 抗体1分子に対して24当量) を加え、チューブローター (MT R-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

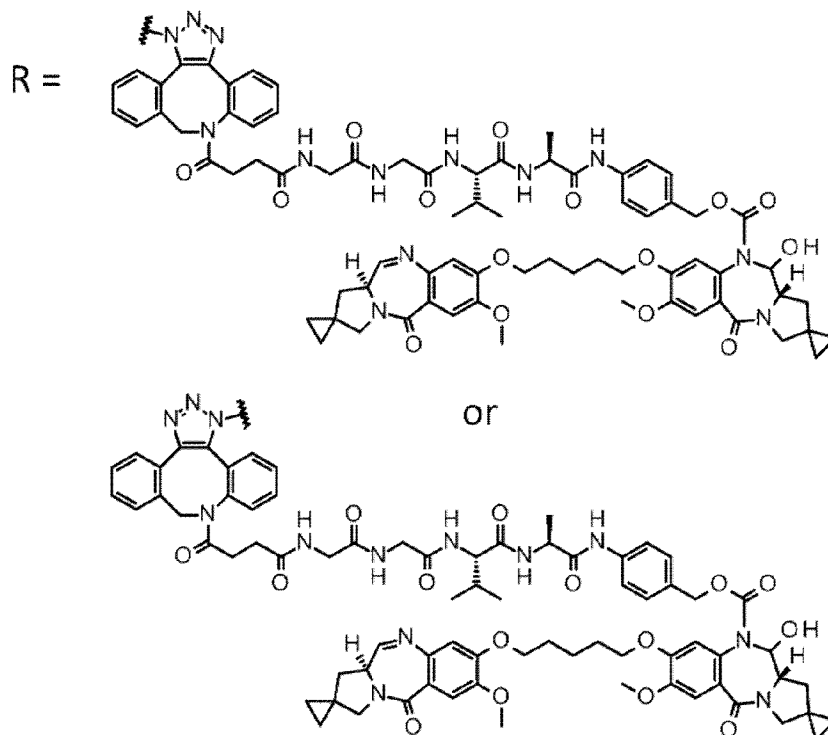
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を10.5mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 0.73mg/mL, 抗体収量 : 7.70mg (77%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 3.8

[0824] 実施例92 : ADC26

[化219]



(工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例92工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0825] 工程1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (9.88mg/mL, 0.500mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.459mL)、実施例15工程10にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0408mL; 抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて1日間反応させた。

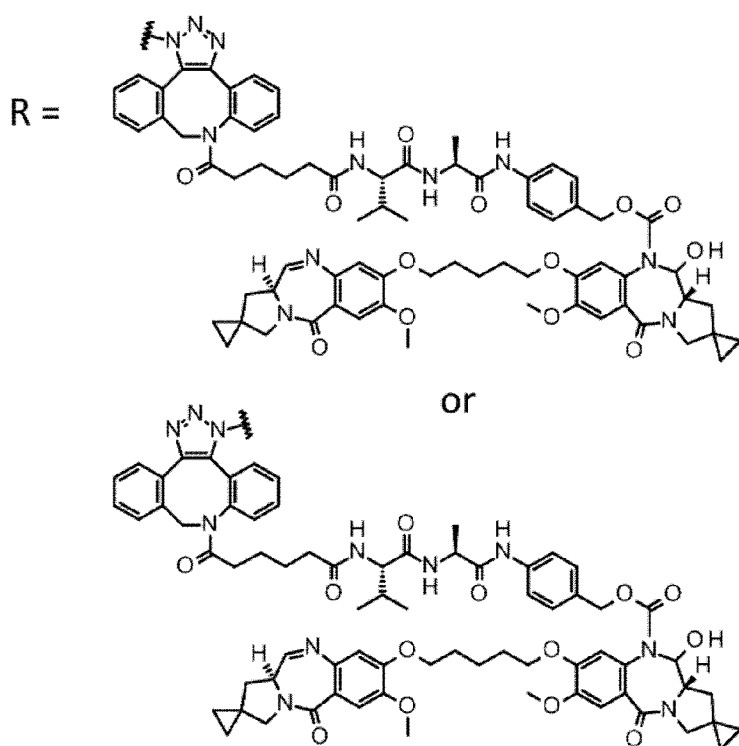
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。この溶液を共通操作Aを用いて濃縮し、目的の化合物を有する溶液を0.420mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 7.27mg/mL, 抗体収量 : 3.54mg (72%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0826] 実施例93 : ADC27

[化220]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例93工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合し

て保持する。)

[0827] 工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 59 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (9.88mg/mL, 1.00mL) に、室温にて 1,2-プロパンジオール (0.917mL)、実施例 16 工程 1 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 1 日間反応させた。

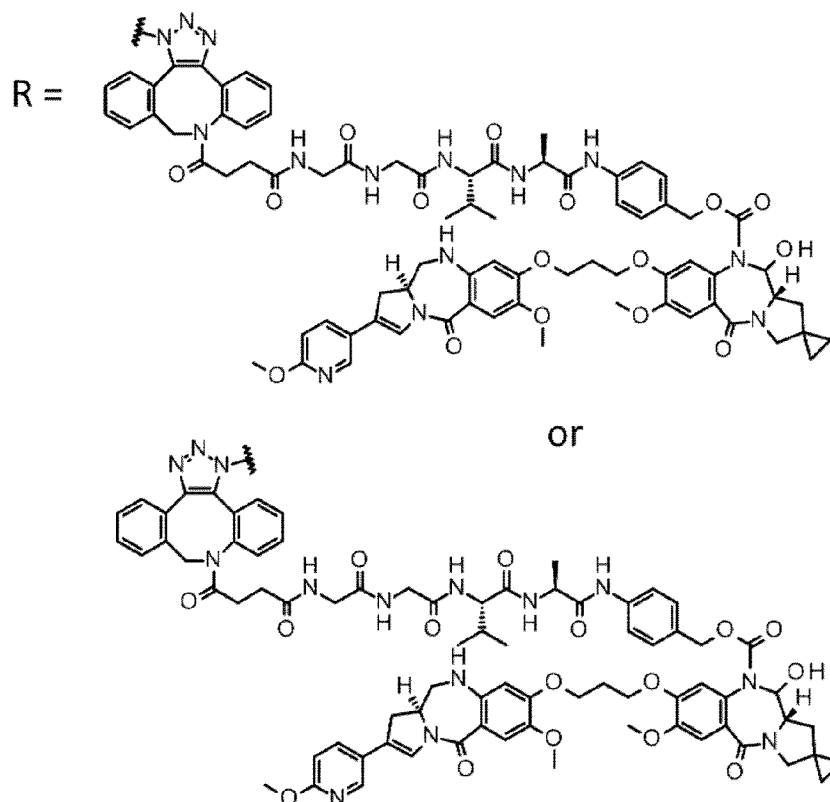
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 10.5mL 得た。この溶液を共通操作 A を用いて濃縮し、目的の化合物を有する溶液を 0.850mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 8.90mg/mL, 抗体収量 : 7.56mg (77%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0828] 実施例 94 : ADC28

[化 221]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例94工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0829] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例17工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

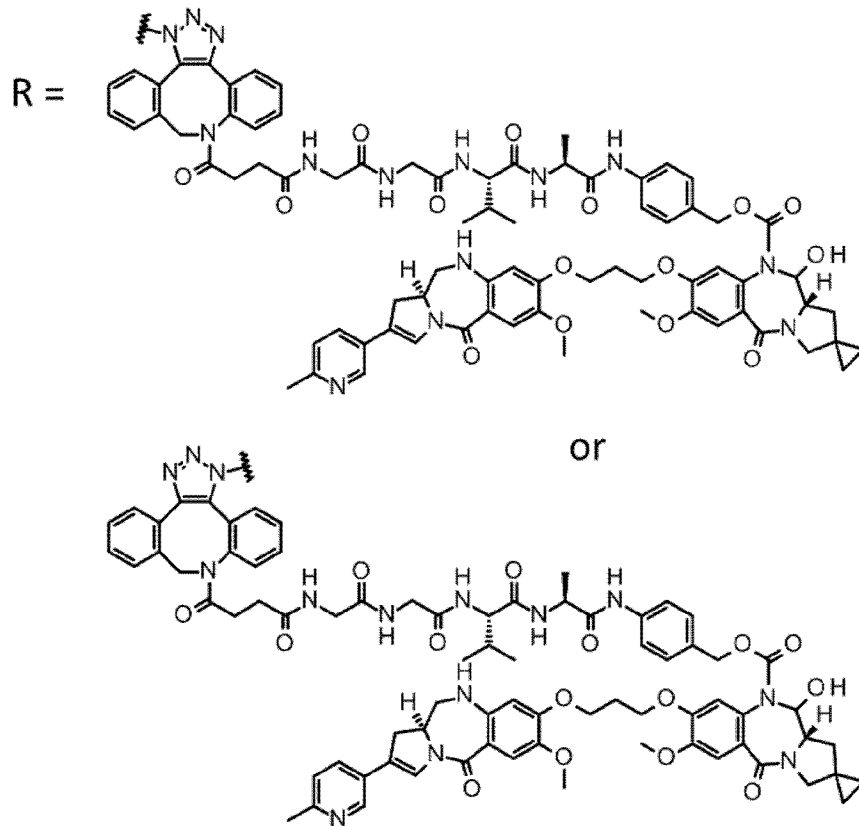
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.24mg/mL , 抗体収量 :7.43mg (73%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.5

[0830] 実施例95 :ADC29

[化222]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例95工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0831] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例18工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MT-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

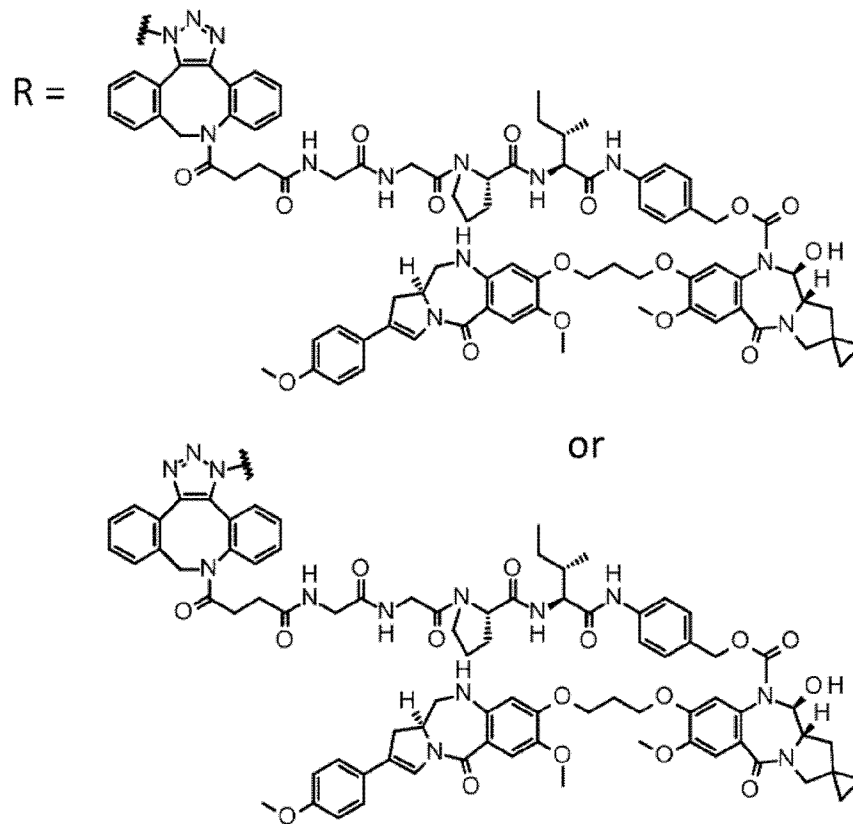
特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.29mg/mL , 抗体収量 :7.76mg (76%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) :1.9

の薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0834] 実施例 97 : ADC3 1

[化 224]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 97 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0835] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 60 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて 1,2_ プロパンジオール (0.917mL、実施例 5 工程 11 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6.0mL 得た。

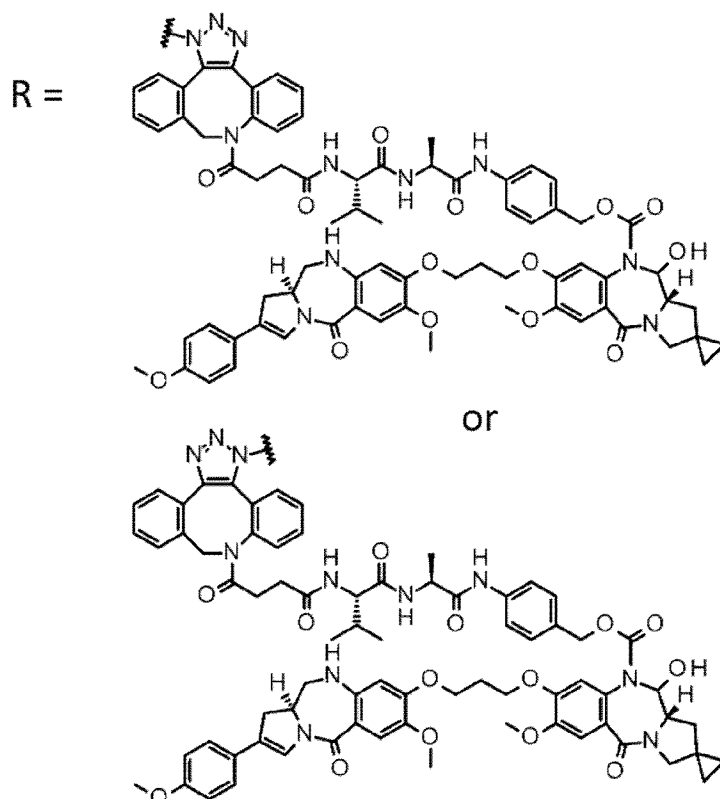
特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.47mg/mL，抗体収量：8.82mg (88%)，抗体一分子あたりの

の薬物平均結合数 (n)：1.8

[0836] 実施例98：ADC32

[化225]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例98工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0837] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL，1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.917mL)、実施例6工程1にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL；抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する

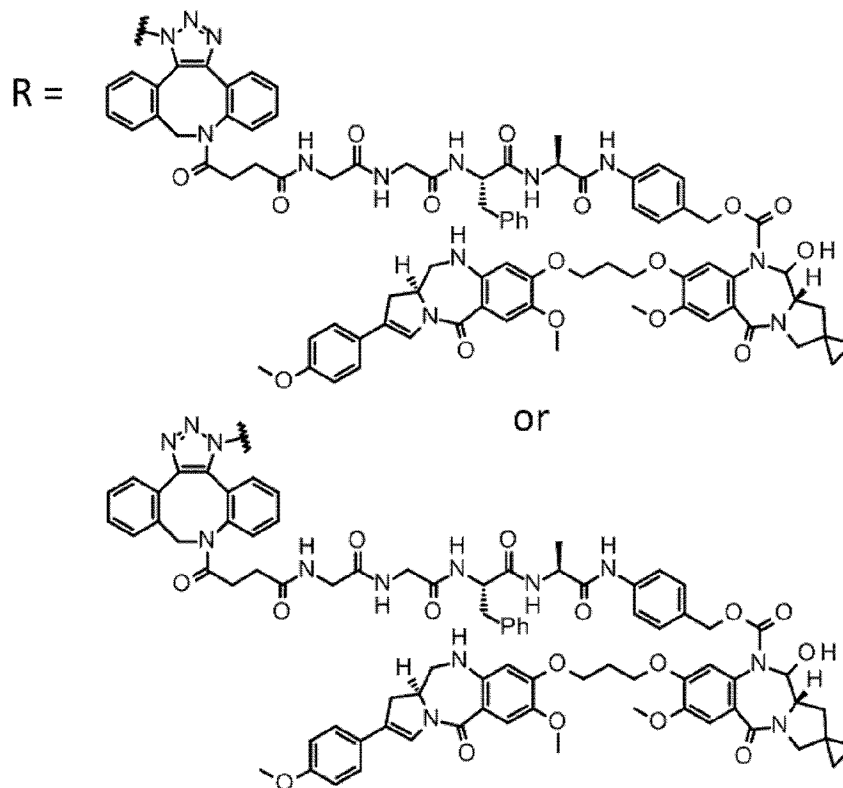
溶液を6.0mL得た。

特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.35mg/mL，抗体収量：8.10mg（81%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.8

[0838] 実施例99：ADC33

[化226]



（工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例99工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。）

[0839] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）溶液（10.0mg/mL，1.00mL）に、室温にて1,2-プロパンジオール（0.917mL、実施例7工程10にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液（0.0825mL；抗体1分子に対して12当量）を加え、チューブローテーター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて、室温にて48時間反応させた。

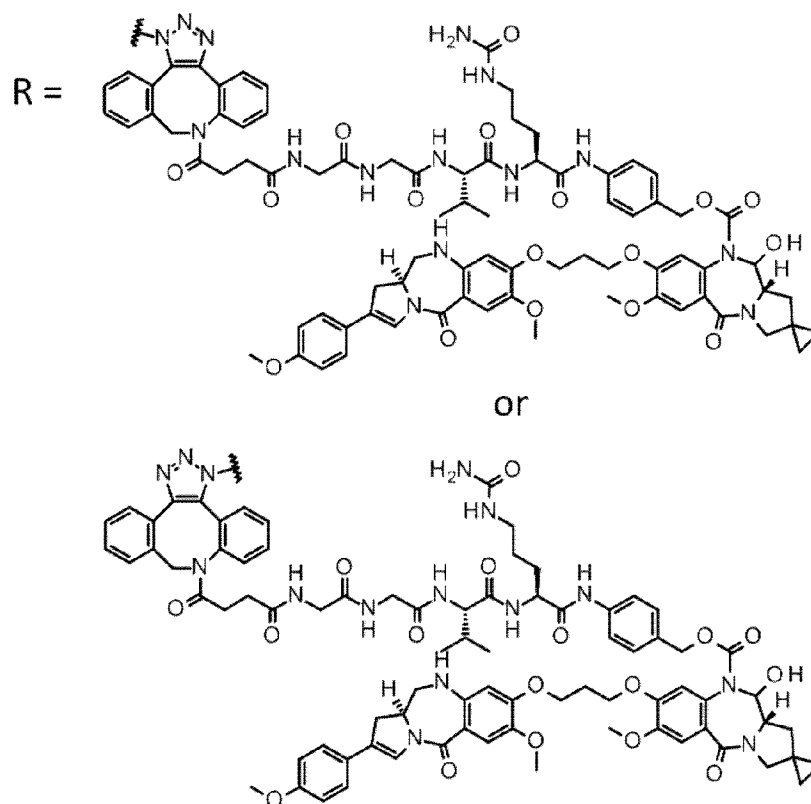
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.41mg/mL , 抗体収量 : 8.44mg (84%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0840] 実施例 100 : ADC34

[化227]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 100 工程 1 で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0841] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL) 、実施例9工程9にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0

0.0825mL ;抗体 1分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

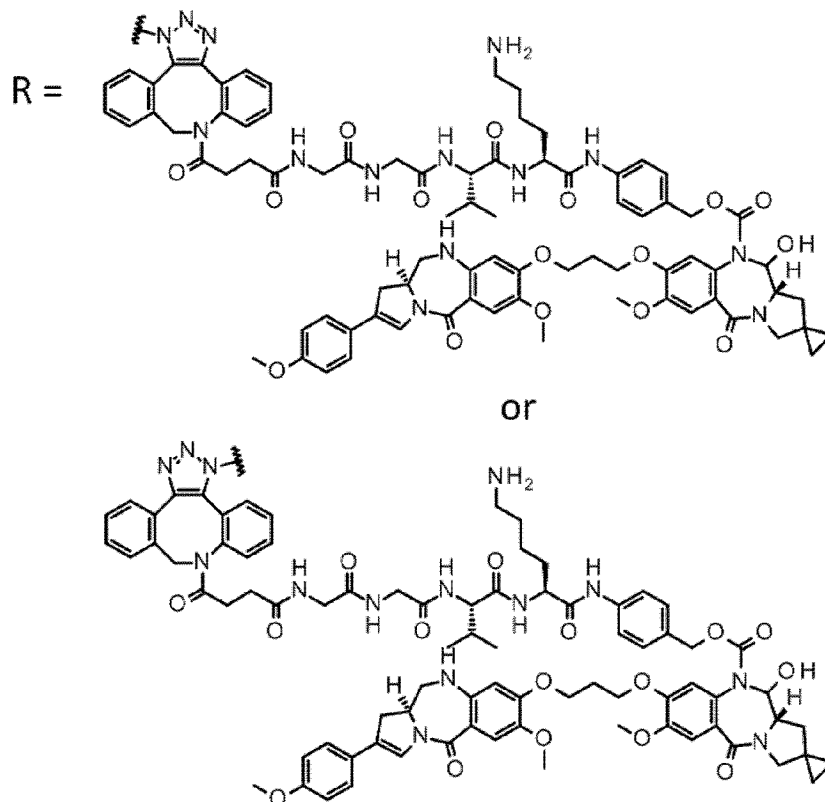
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6.0mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.47mg/mL , 抗体収量 : 8.79mg (88%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0842] 実施例 101 : ADC35

[化 228]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 101 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0843] 工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 60 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて 1,2-プロパンジオール (0.917mL

、実施例10工程14にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液
(0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量)を加え、チューブローテーター
(MTR-103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて48時間反応させた。

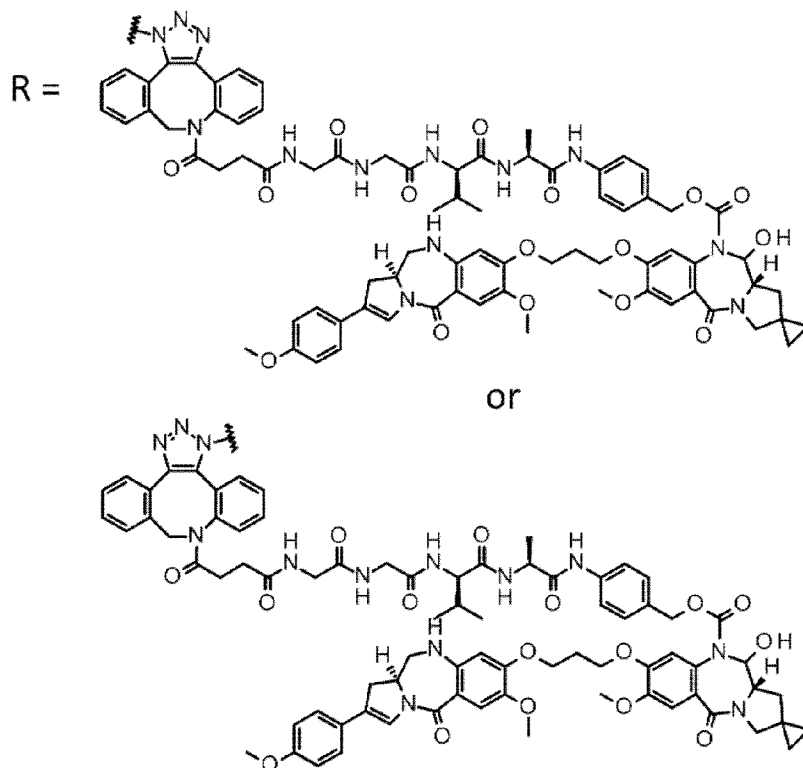
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する
溶液を6.0mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.67mg/mL , 抗体収量 :10.0mg (定量的) , 抗体一分子あた
りの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0844] 実施例102 :ADC36

[化229]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例103工程1
で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合
して保持する。)

[0845] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (

10. 0mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて1, 2_ プロパンジオール (0. 917mL) 、実施例11工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (M TR- 103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

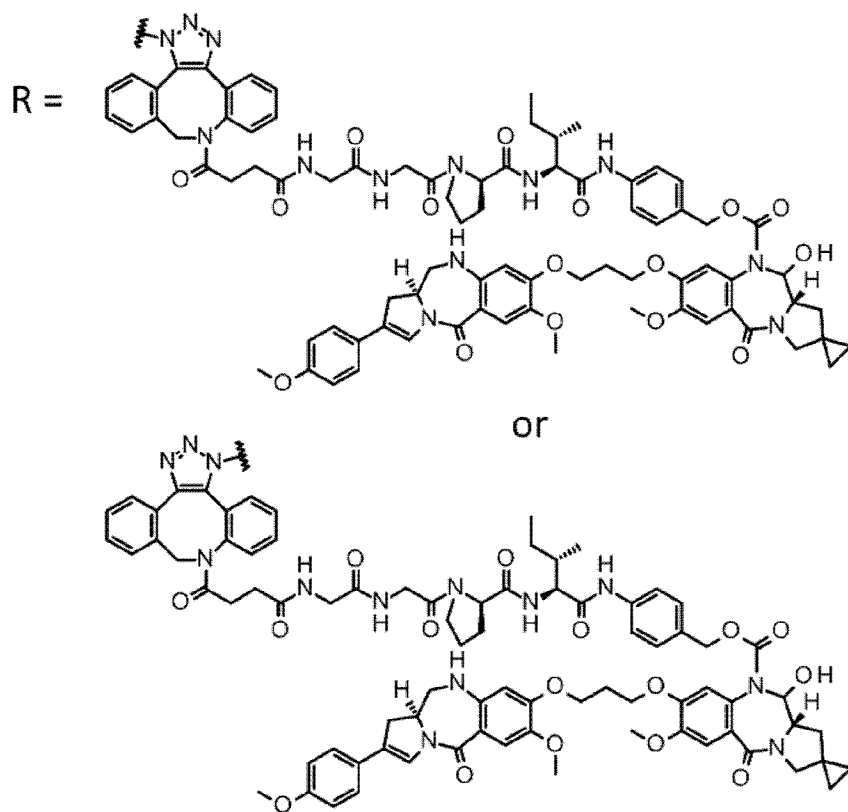
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 40mg/mL , 抗体収量 : 8. 39mg (84%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1. 8

[0846] 实施例 103 :ADC37

[化 230]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例103工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0847] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例12工程14にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量)を加え、チューブローテーター (MT-103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて48時間反応させた。

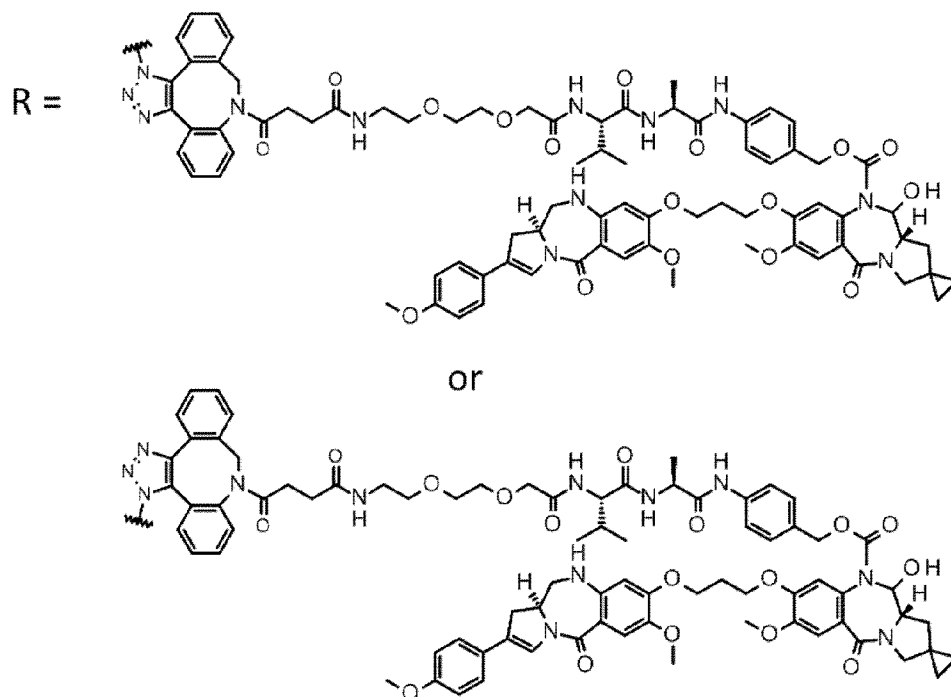
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.41mg/mL , 抗体収量 :8.49mg (85%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) :1.8

[0848] 実施例104 :ADC :38

[化231]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例104工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

実施例60工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例14工程1にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

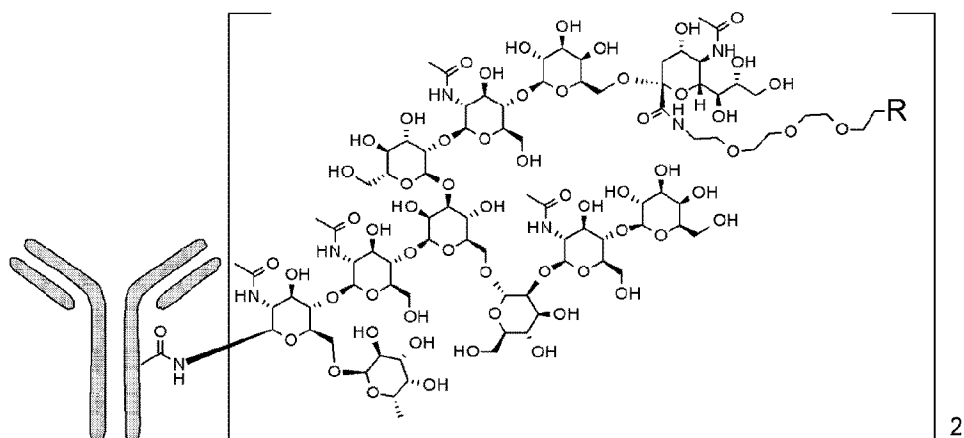
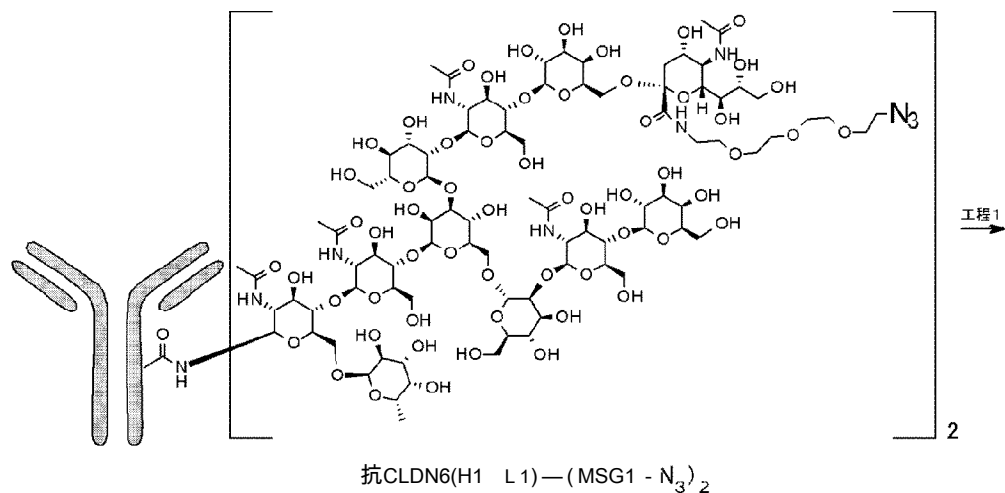
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

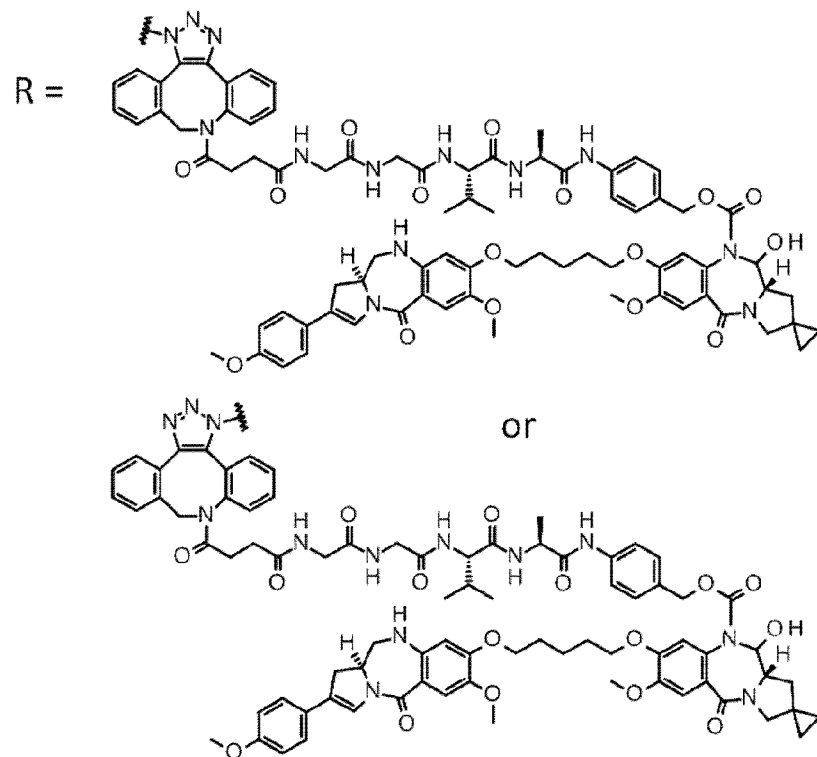
特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.72mg/mL, 抗体収量 : 10.3mg (定量的), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0852] 実施例106 : ADC40

[化233]





(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 106 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0853] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 61 工程 2 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) 溶液 (10. 2mg/mL , 2. 50mL) に、室温にて 1, 2- プロパンジオール (2. 29mL)、実施例 3 工程 13 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (10. 206mL ; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

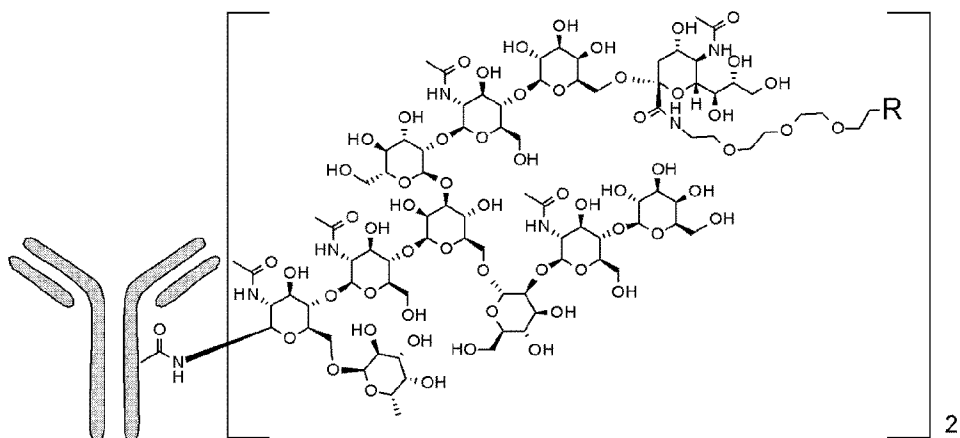
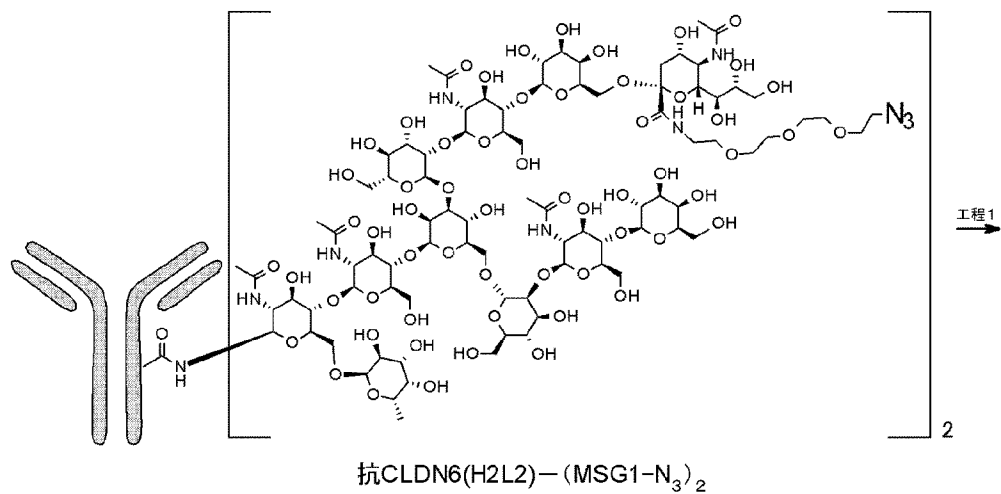
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 14. 5mL 得た。

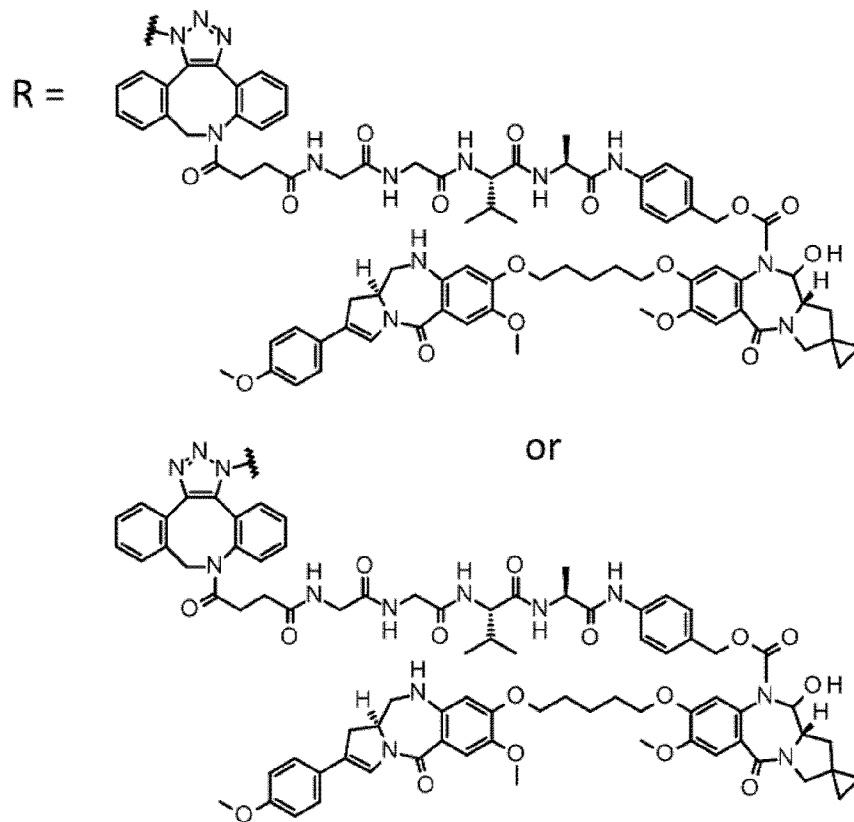
特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 54mg/mL , 抗体収量 : 22. 3mg (89%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1. 9

[0854] 実施例 107 : ADC41

[化234]





(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例107工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0855] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例62工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (9.96mg/mL, 2.50mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (2.29mL)、実施例3工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.206mL; 抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

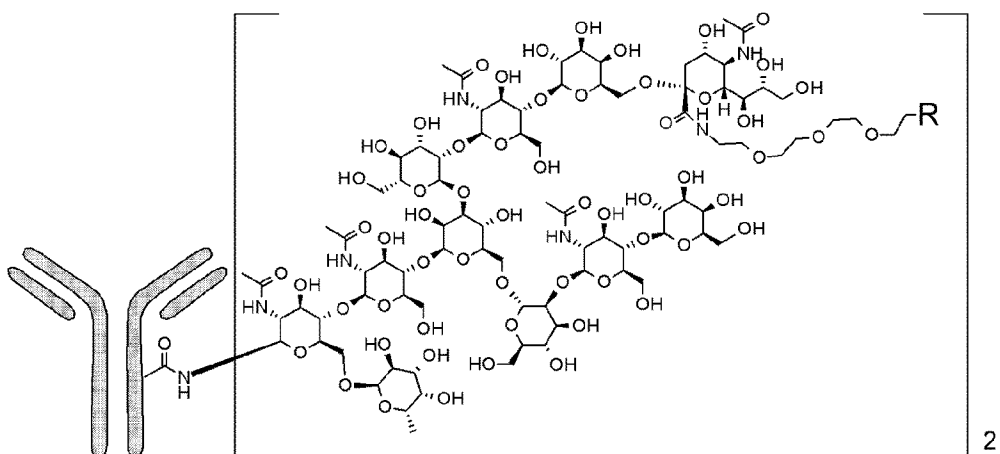
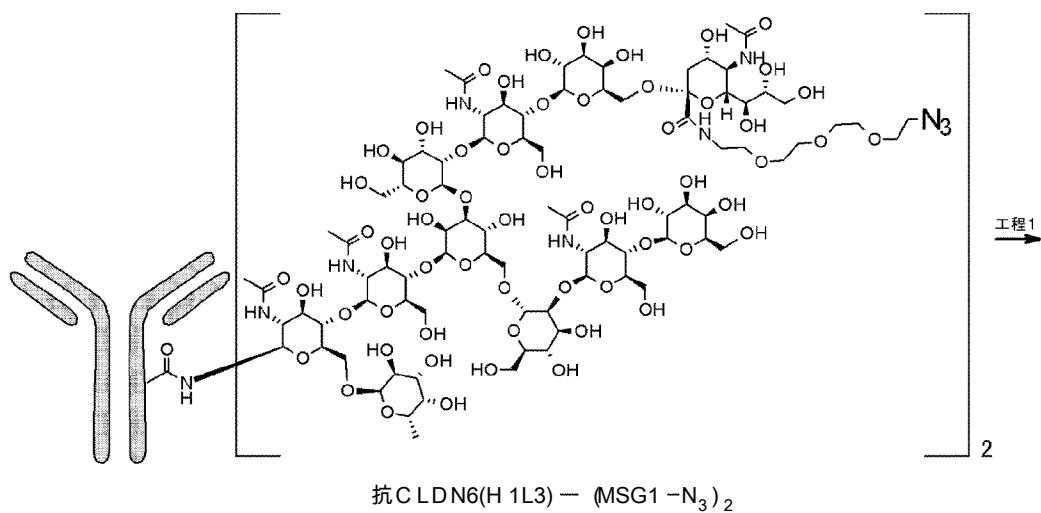
精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を14.5mL得た。

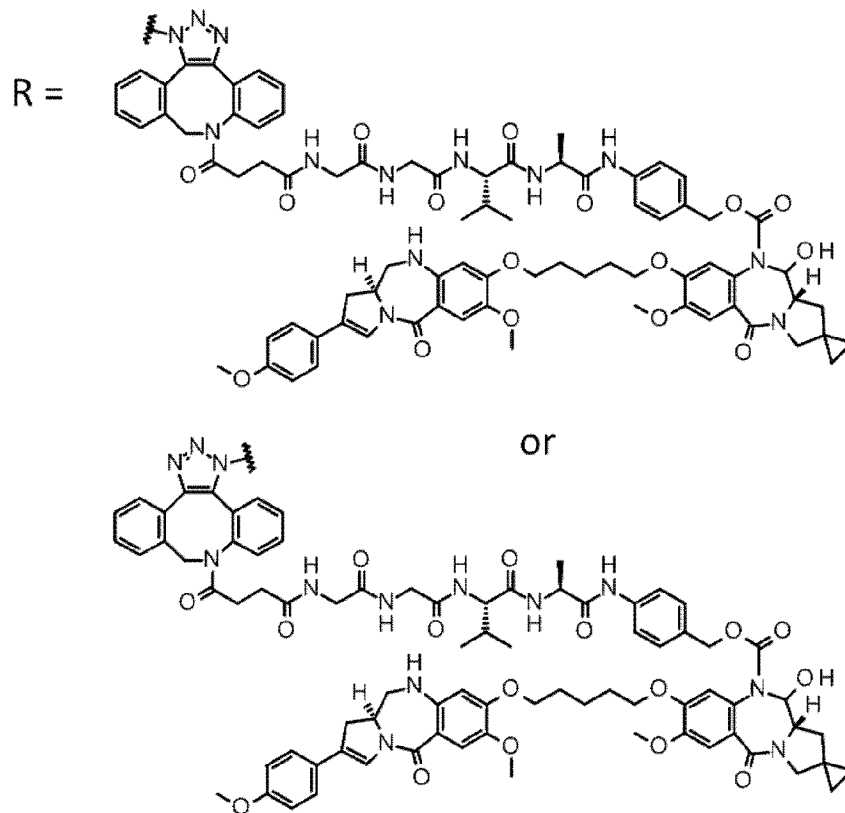
特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.52mg/mL, 抗体収量：22.0mg (88%), 抗体1分子あたりの薬物平均結合数 (n)：1.9

[0856] 実施例 108 :ADC42

[化 235]





(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例108工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0857] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例63工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (9.83mg/mL, 2.50mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (2.29mL)、実施例3工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.206mL; 抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

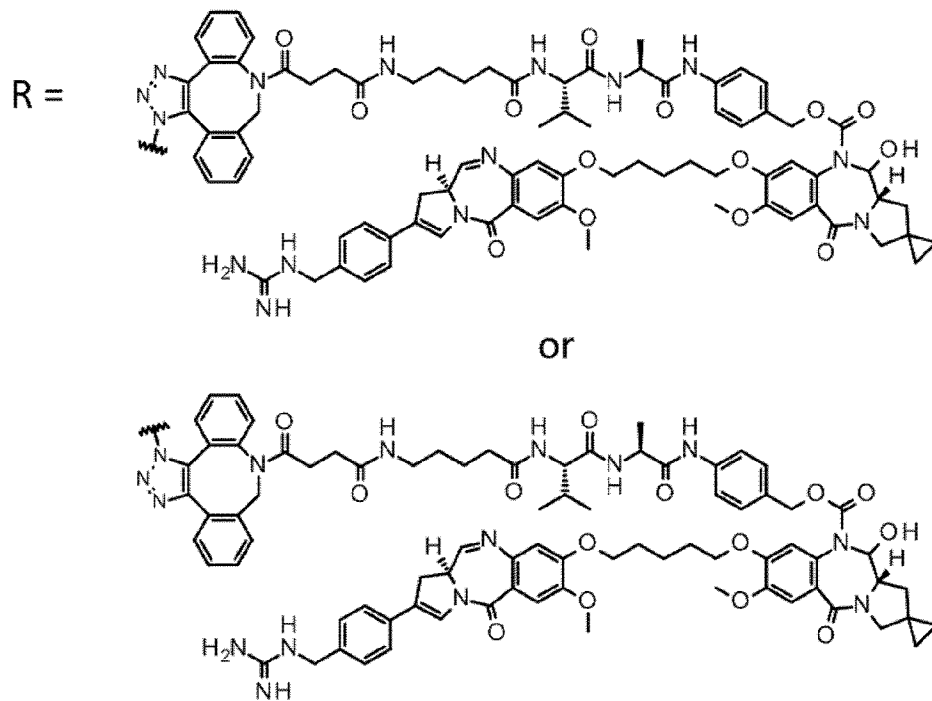
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を14.5mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.45mg/mL, 抗体収量 :21.0mg (84%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) :1.9

[0858] 実施例109 :ADC43

[化236]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例109工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0859] 工程1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例42工程16にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて48時間反応させた。

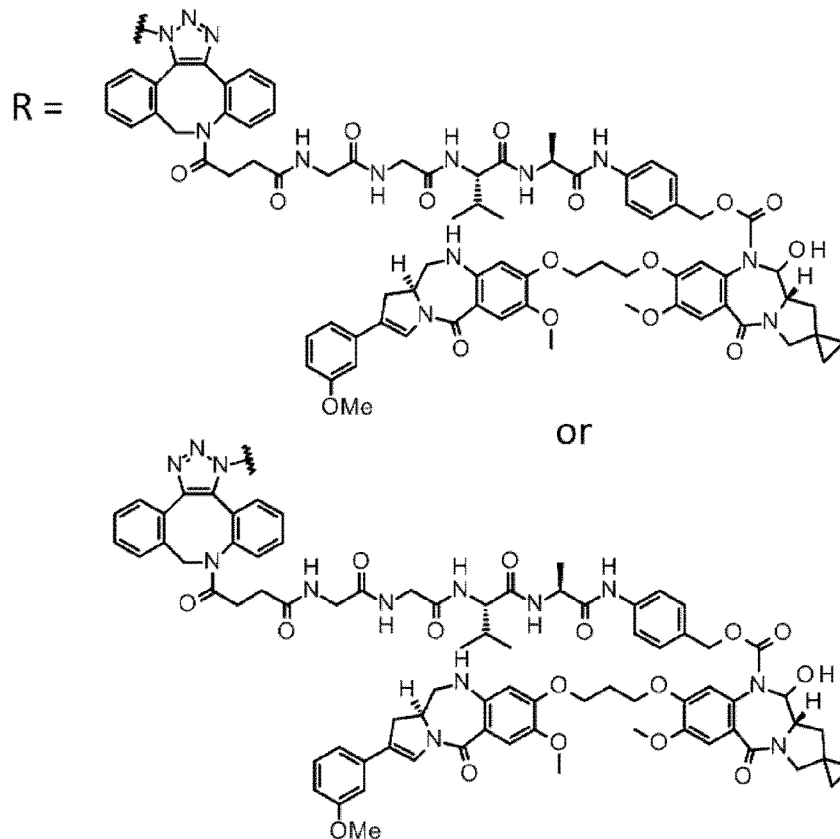
精製操作 :上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を3.0mL得た。

特性評価 :共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 :1.30mg/mL , 抗体収量 :7.79mg (78%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) :1.9

[0860] 実施例110 :ADC44

[化 237]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 110 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0861] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 59 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて 1,2-プロパンジオール (0.917mL)、実施例 43 工程 8 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6.0mL 得た。

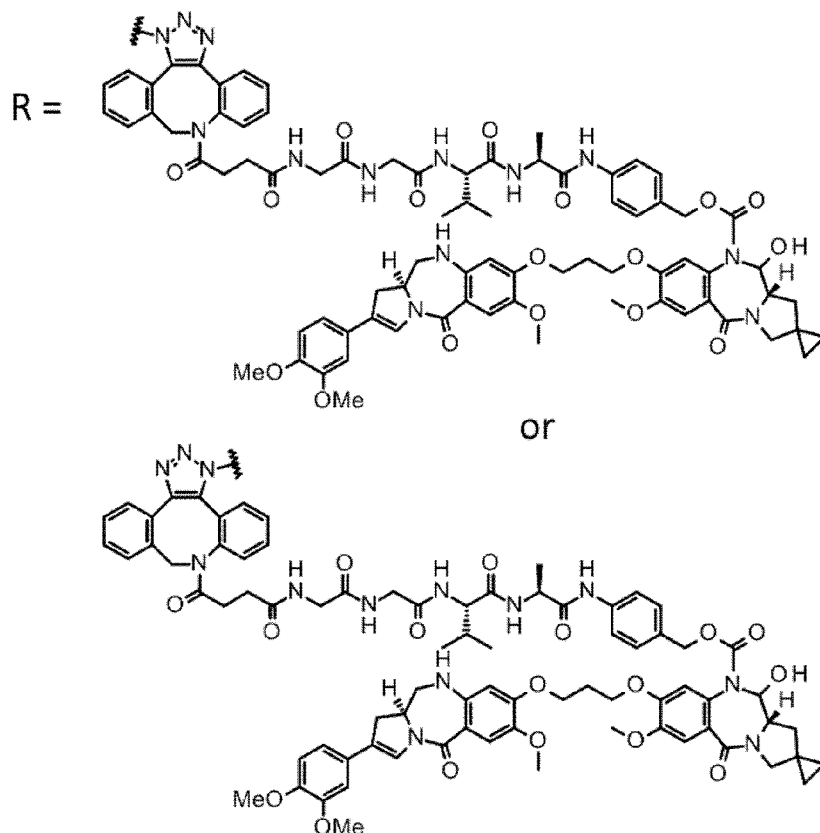
特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 0.93mg/mL, 抗体収量 : 5.58mg (56%), 抗体一分子あたり

の薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0862] 实施例 111 :ADC45

[化 238]



(工程 1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 1 1 1 工程 1
で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合
して保持する。)

[0863] 工程 1 :抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL) 、実施例44工程8にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ;抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温に48時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.0mL得た。

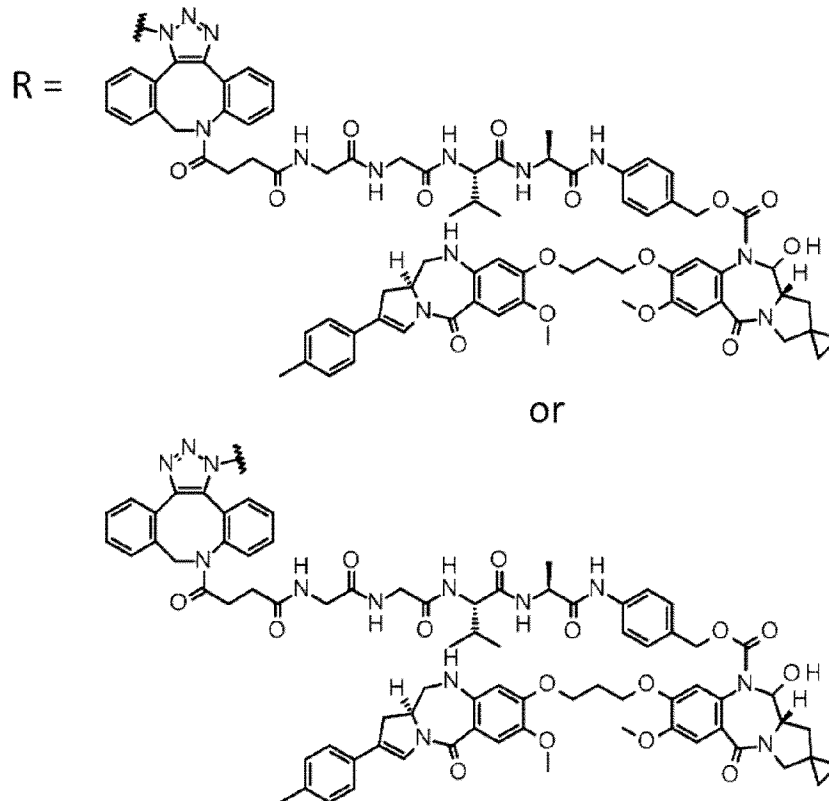
特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 0.99mg/mL , 抗体収量 : 5.95mg (59%) , 抗体一分子あたり

の薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0864] 実施例 112 : ADC46

[化 239]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 112 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0865] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 59 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL , 1.00mL) に、室温にて 1,2_ プロパンジオール (0.917mL) 、実施例 31 工程 8 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL ; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 2 日間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する

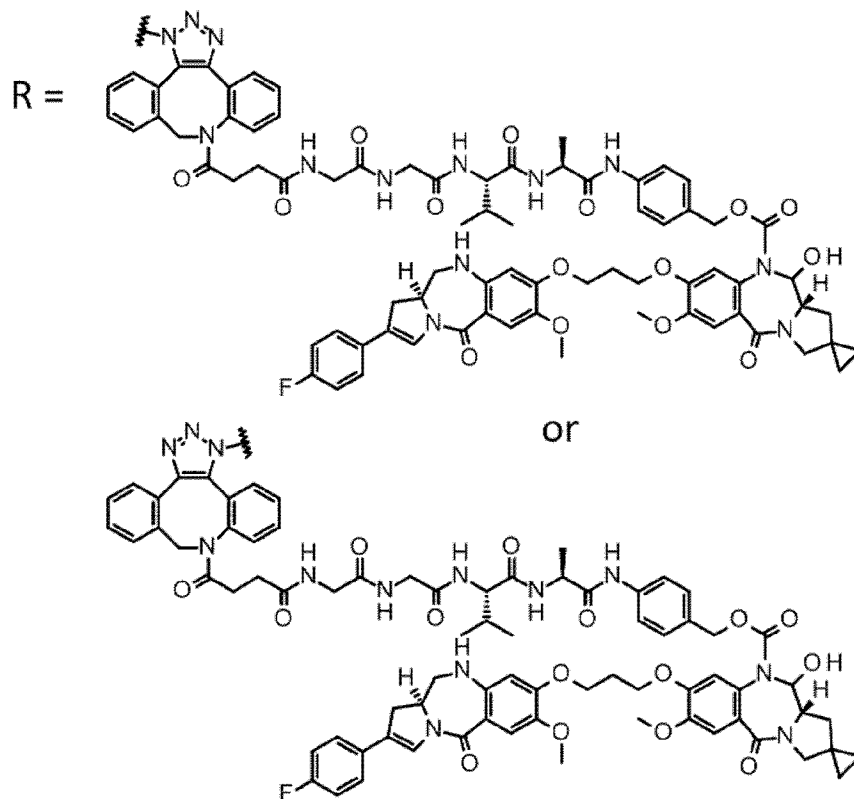
溶液を6.00mL得た。

特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.49mg/mL，抗体収量：8.94mg (89%)，抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：1.9

[0866] 実施例113：ADC47

[化240]



(工程1で形成されるトリアゾール環は幾何異性を有し、実施例113工程1で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0867] 工程1：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL，1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.917mL、実施例32工程8にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL；抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

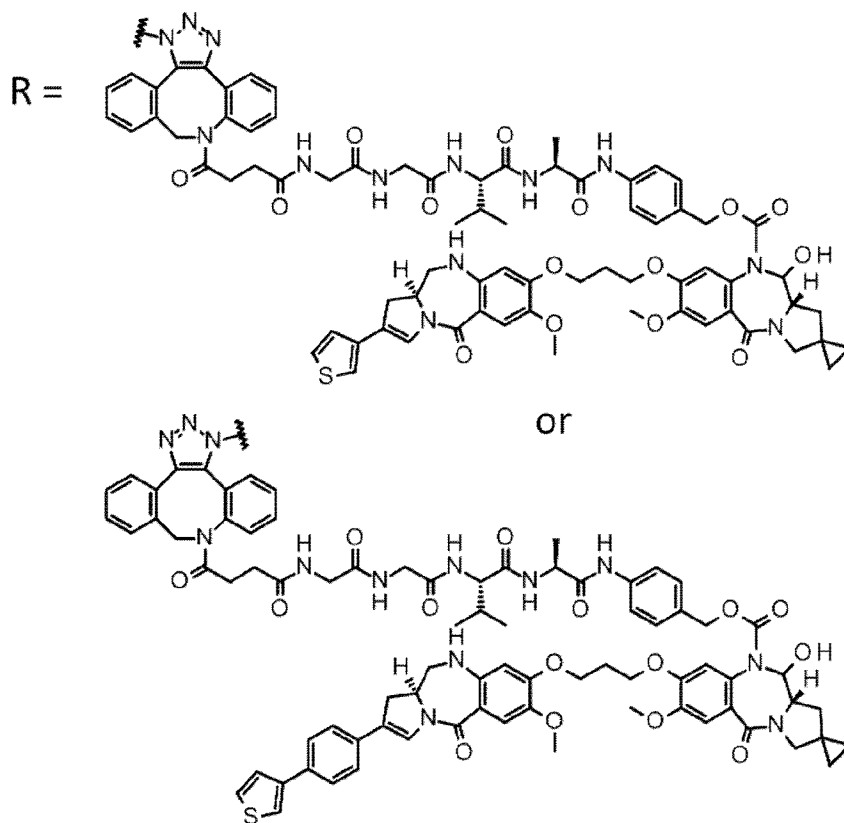
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

特性評価 : 共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.45mg/mL , 抗体収量 : 8.73mg (87%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0868] 実施例 114 : ADC48

[化241]



(工程1で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 114 工程 1 で得られた化合物は上記Rとして示した2種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0869] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例59工程1にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL , 1.00mL) に、室温にて1,2_プロパンジオール (0.917mL) 、実施例33工程8にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (

0.0825mL ;抗体 1 分子 に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 2 日間反応させた。

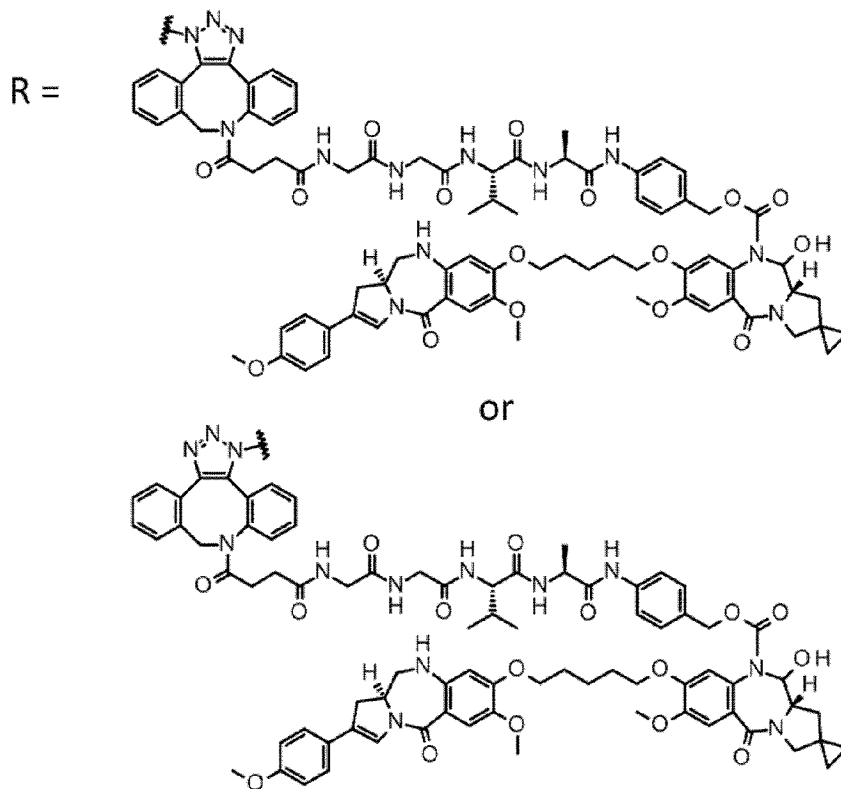
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6.00mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.45mg/mL , 抗体収量 : 8.70mg (87%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9

[0870] 実施例 115 : ADC49

[化 242]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 115 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0871] 工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 60 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL , 1.00mL) に、室温にて 1,2-プロパンジオール (0.917mL

、実施例3工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液（0.0825mL；抗体1分子に対して12当量）を加え、チューブローテーター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて、室温にて2日間反応させた。

精製操作：上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

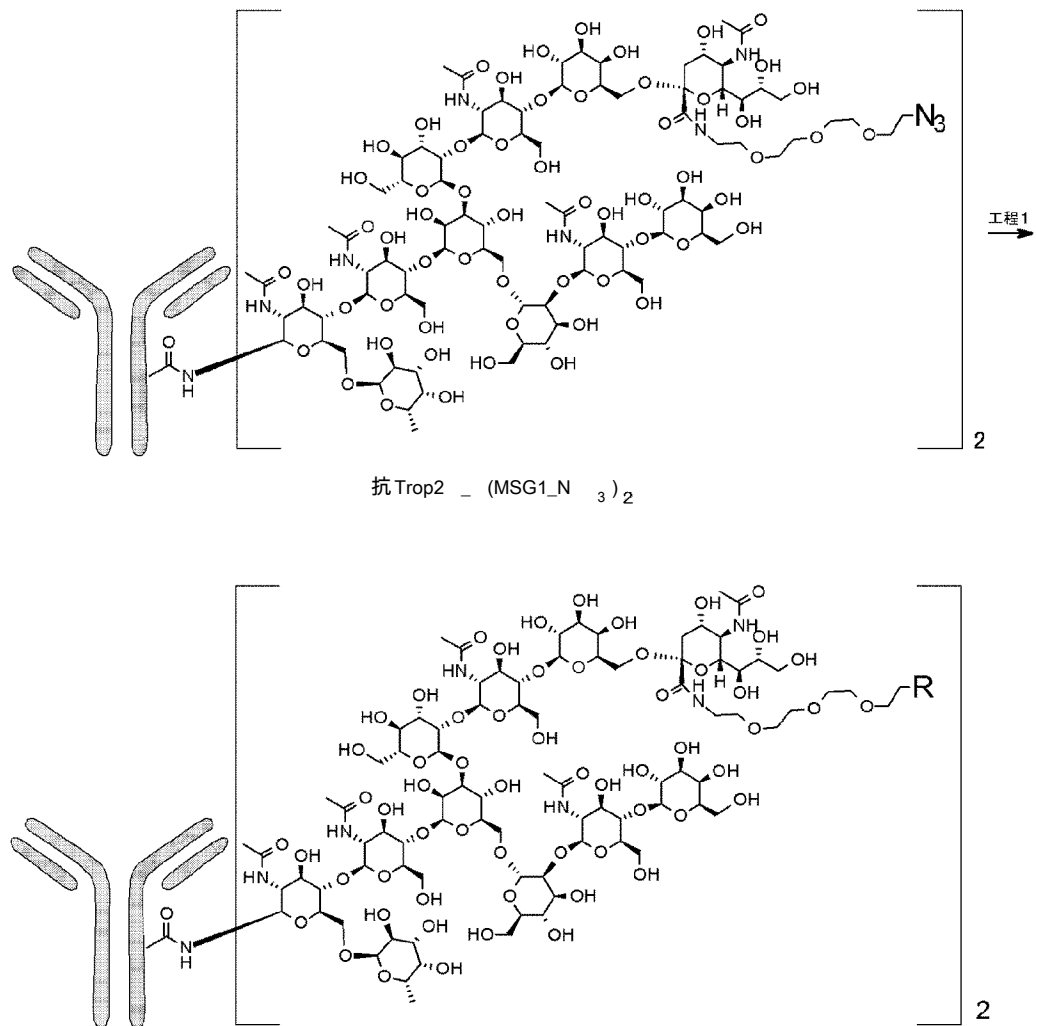
特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

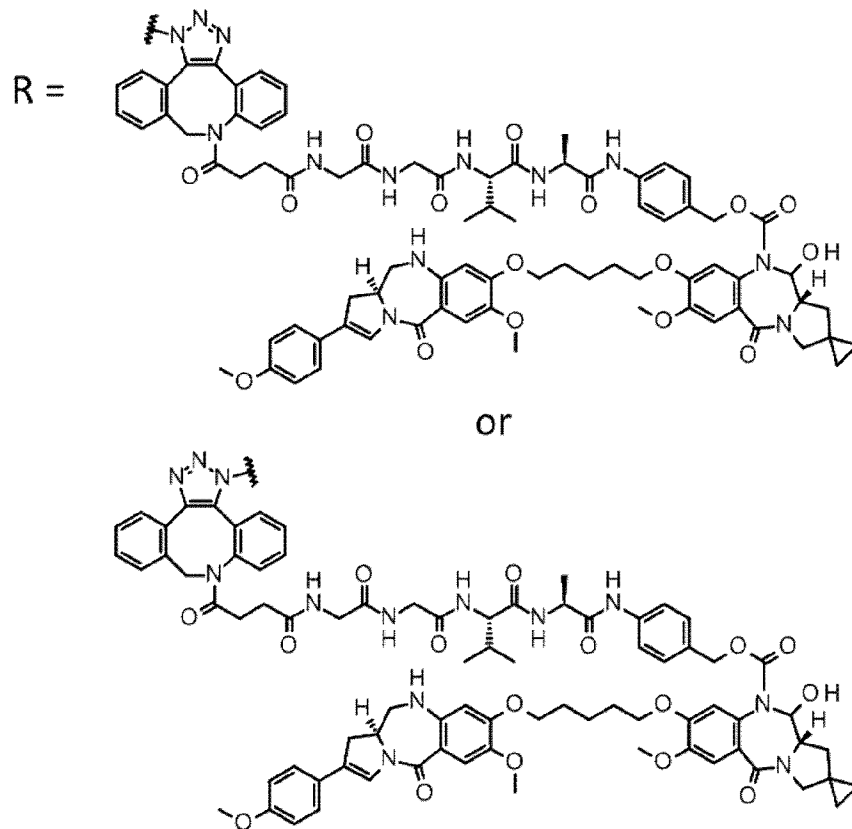
抗体濃度：1.41mg/mL，抗体収量：8.45mg（85%），抗体一分子あたりの

の薬物平均結合数（n）：1.9

[0872] 実施例116：ADC50

[化243]





(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 116 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0873] 工程 1 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例65工程2にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10mg/mL, 1.00mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール (0.917mL、実施例3工程13にて得られた化合物を10mM含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL; 抗体1分子に対して12当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて2日間反応させた。

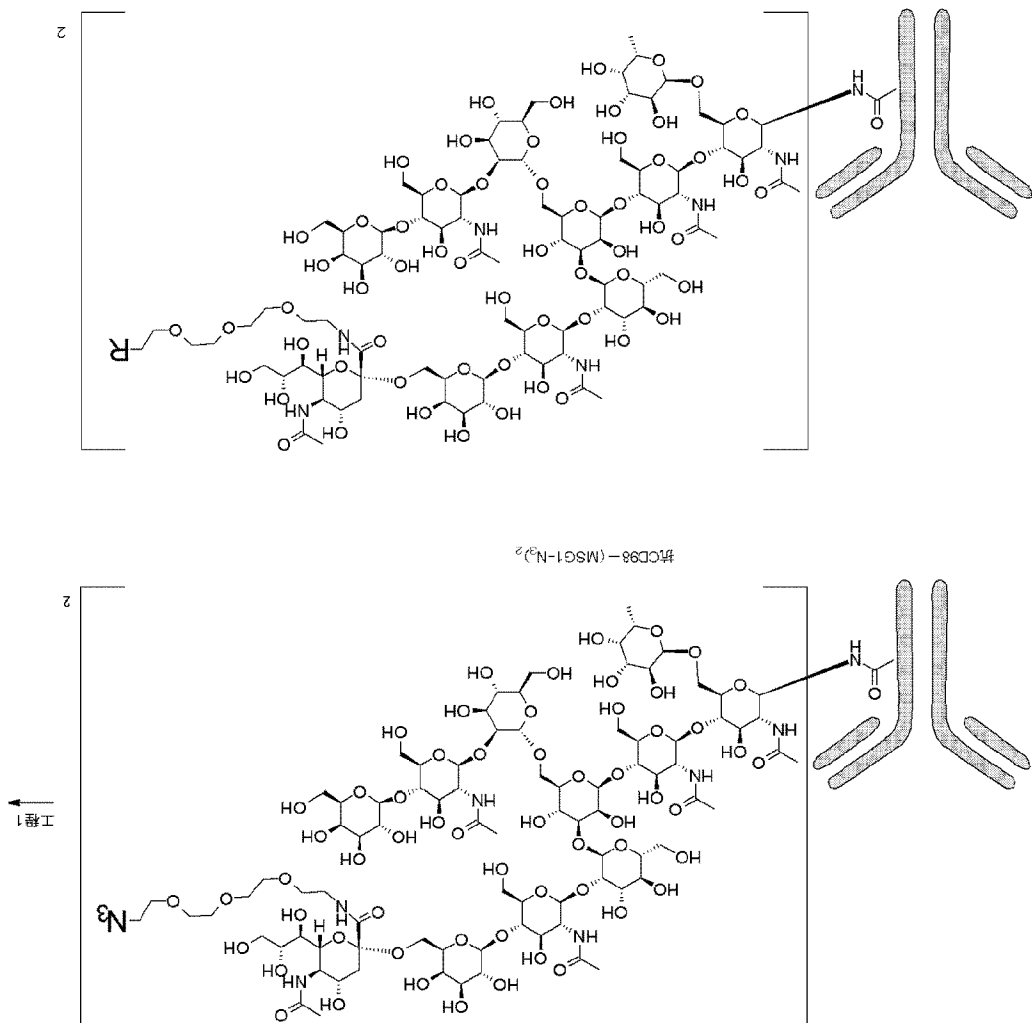
精製操作 : 上記溶液を共通操作Dを用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を6.00mL得た。

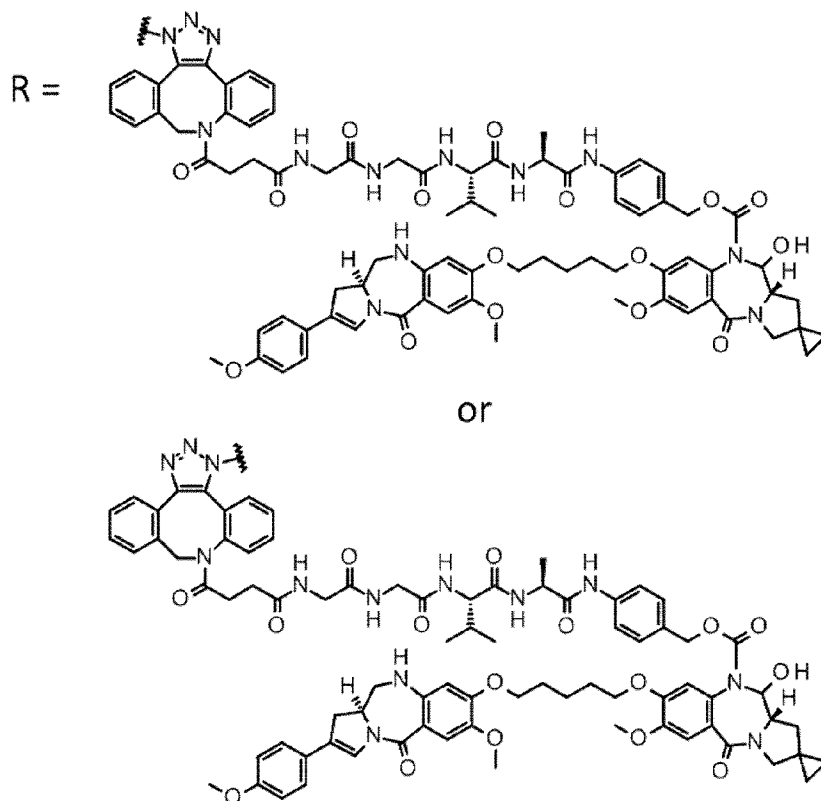
特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 47mg/mL , 抗体収量 : 8. 8mg (88%) , 抗体一分子あたりの
薬物平均結合数 (n) : 1. 9

实施例 117 : 190aV [17Z.80]

[17ま]





(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 1 1 7 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0875] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 6 4 工程 2 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6. 0) 溶液 (10. 2mg/mL , 1. 00mL) に、室温にて 1 , 2 _ プロパンジオール (0. 917mL、実施例 3 工程 13 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0. 0825mL ; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR - 103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 2 日間反応させた。

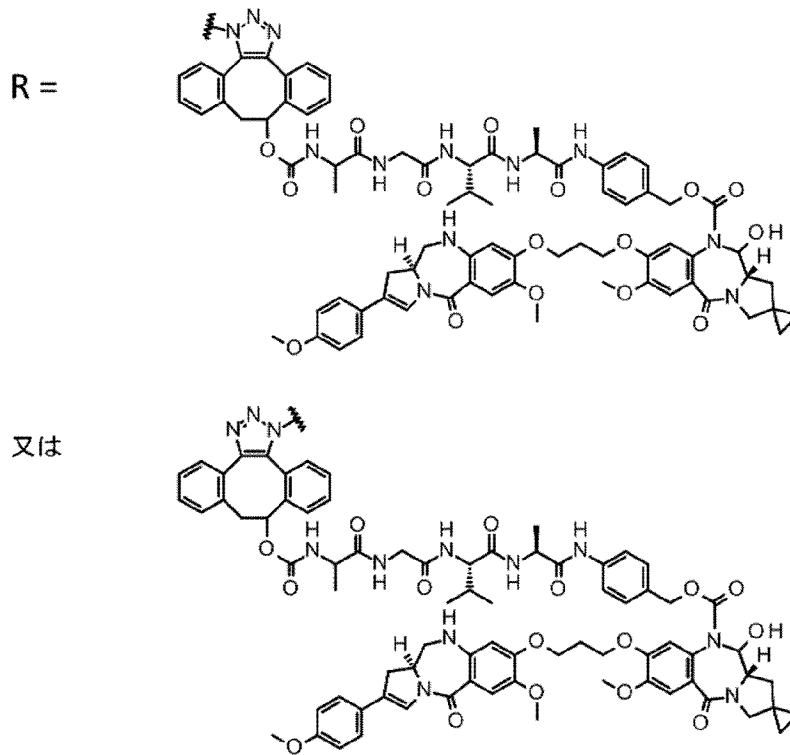
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6. 00mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 36mg/mL , 抗体収量 : 8. 19mg (82%) , 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1. 8

[0876] 実施例 118 : ADC52

[化 245]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 118 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0877] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 60 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて 1,2_プロパンジオール (0.917mL)、実施例 8 工程 2 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 3 日間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6.00mL 得た。

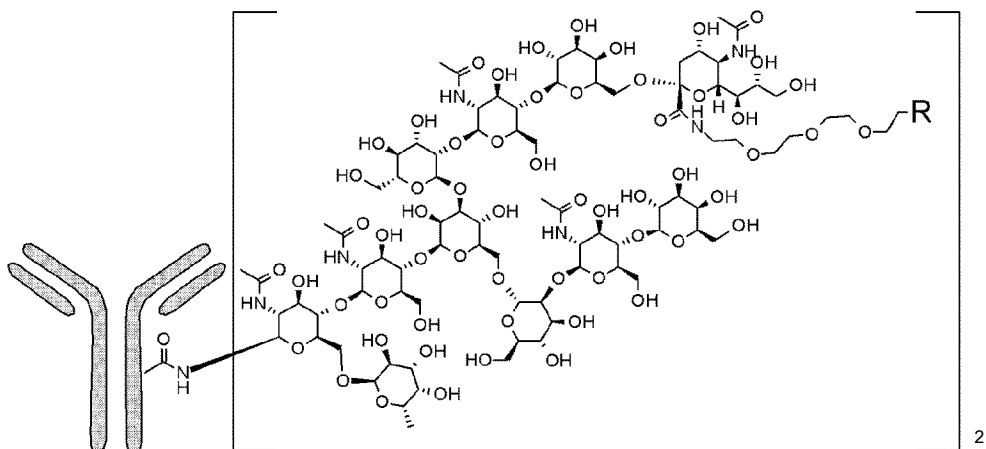
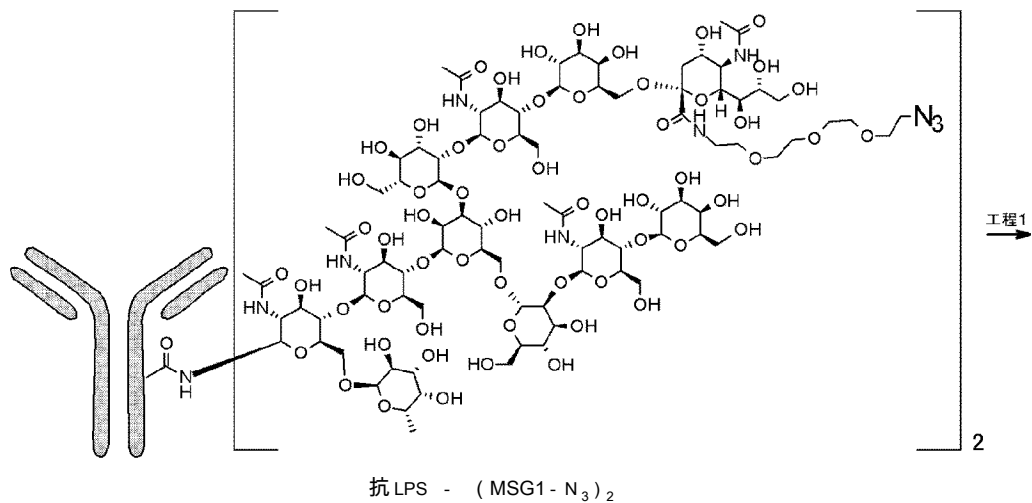
特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

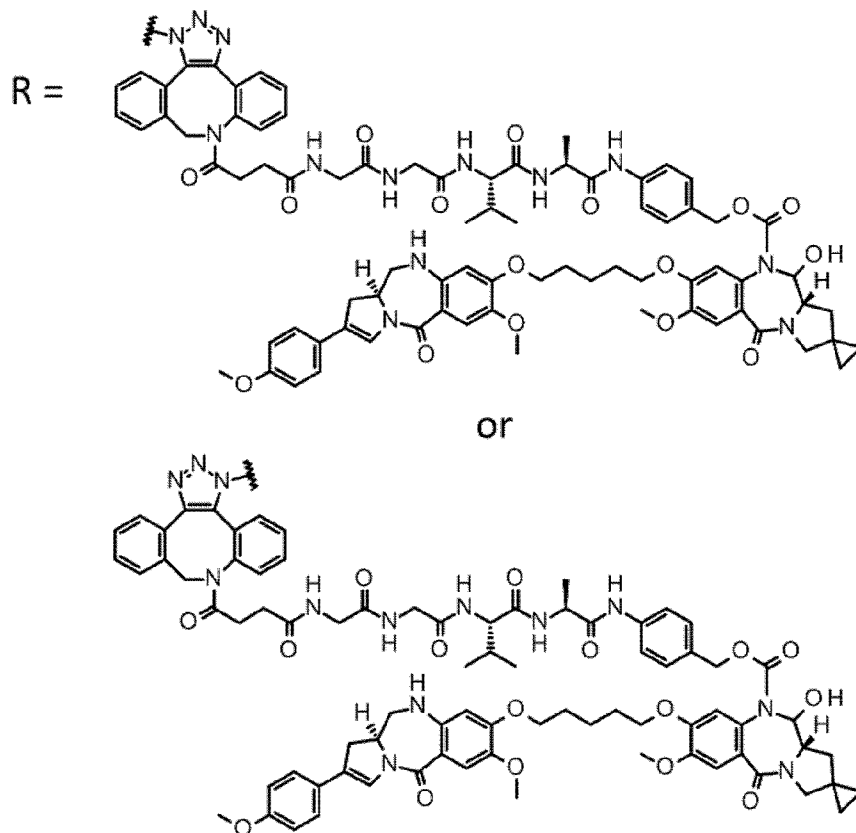
抗体濃度 : 1.06mg/mL, 抗体収量 : 6.35mg (63%) , 抗体一分子あたり

の薬物平均結合数 (n) : 1.2

[0878] 実施例 119 : ADC53

[化 246]





工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 119 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[0879] 工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 66 工程 2 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) 溶液 (9.89mg/mL, 0.40mL) に、室温にて 1,2-プロパンジオール (0.367mL)、実施例 3 工程 13 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0328mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローテーター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 2 日間反応させた。

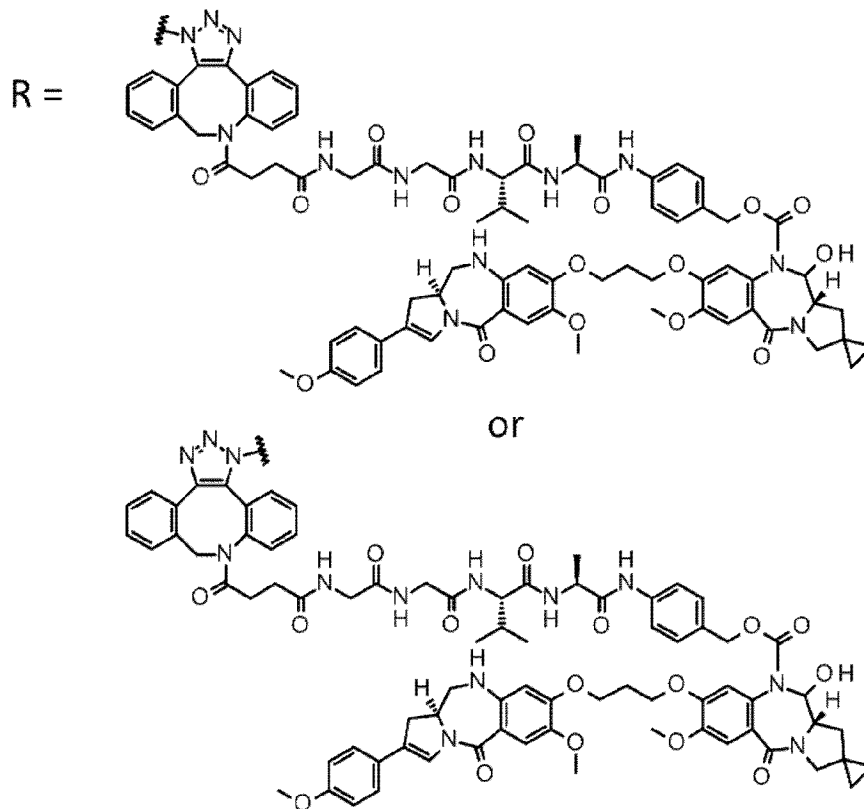
精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 2.50mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 16mg/mL, 抗体収量 : 2. 89mg (72%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0880] 実施例 120 :ADC54

[化 247]



(工程 1 で形成される トリアゾール環は幾何異性を有し、実施例 120 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

[088 1] 工程 1 :抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 59 工程 1 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.0mg/mL, 1.00mL) に、室温にて 1,2-プロパンジオール (0.917mL)、実施例 4 工程 12 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルスルホキシド溶液 (0.0825mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 6mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1.49mg/mL, 抗体収量 : 8.94mg (89%), 抗体一分子あたり

の薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0882] 実施例 121 : 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗細胞効果 (1)

HER2 抗原陽性細胞のヒト胃癌株である NCI — N87 (American Type Culture Collection ; ATCC CRL-5822) は、10% のウシ胎児血清 (HyClone) を含む RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific ; 以下、RPMI 培地) で培養した。HER2 抗原陰性細胞の MDA_MB_468 (ATCC HTB-132) は、10% のウシ胎児血清 (HyClone) を含む Leibovitz' s 15 Medium (Thermo Fisher Scientific ; 以下、Leibovitz' s 培地) で培養した。NCI — N87 を RPMI 培地、MDA — MB — 468 細胞を Leibovitz' s 培地で、それぞれ 2.5×10^4 Cells/mL になるように調製し、96 穴細胞培養用マイクロプレートに $80 \mu\text{L}$ ずつ添加した。細胞添加後、NCI — N87 は 37°C 、5% CO_2 下で一晩培養し、MDA — MB — 468 は 37°C 、 CO_2 濃度設定なし下で一晩培養した。

翌日、RPMI 培地又は Leibovitz' s 培地で 100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、0.001 nM に希釈した抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲートをマイクロプレートに $20 \mu\text{L}$ ずつ添加した。抗体 - 薬物コンジュゲート非添加ウェルには RPMI 培地又は Leibovitz' s 培地を $20 \mu\text{L}$ ずつ添加した。NCI — N87 は 37°C 、5% CO_2 下で 6 日間、MDA — MB — 468 は 37°C 、 CO_2 濃度設定なし下で 6 日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出して室温で 30 分間静置した。培養液と等量の Ce は Titer-G Lo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を添加してプレートミキサーで攪拌した。室温で 10 分間静置後にプレートリーダー (PerkinElmer) で発光量を計測した。

生細胞率は次式で算出した。

$$\text{生細胞率 (\%)} = a \div b \times 100$$

a : 被験物質添加ウェルの発光量の平均値

b : 培地添加ウェルの発光量の平均値

IC_{50} 値は次式で算出した。

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{anti-log} \left((50-d) \times (\text{LOG}_{10}(b) - \text{LOG}_{10}(a)) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}(b) \right)$$

a : 被験物質の濃度 a

b : 被験物質の濃度 b

c : 濃度 a の被験物質を添加した時の生細胞率

d : 濃度 b の被験物質を添加した時の生細胞率

a、b は生細胞率 50% を挟む 2 点で $a > b$ 。

NCI — N87 細胞に対して抗体 - 薬物コンジュゲート ADC 17、ADC 18、ADC 1、ADC 54、ADC20、ADC34、ADC23、ADC24、ADC25 は $IC_{50} < 0.001$ (nM) の抗細胞効果を示した。抗体 - 薬物コンジュゲート ADC26、ADC27、ADC 16、ADC 11、ADC 12、ADC2、ADC3、ADC4、ADC43、ADC5、ADC21、ADC48、ADC44、ADC6、ADC7、ADC28、ADC29、ADC 13、ADC 14、ADC30、ADC31、ADC32、ADC33、ADC35、ADC36、ADC8、ADC9、ADC38、ADC39 は $0.001 \leq IC_{50} < 0.1$ (nM) の抗細胞効果を示した。また、いずれの抗体 - 薬物コンジュゲートも MDA — MB — 468 細胞に対しては抗細胞効果を示さなかった ($IC_{50} > 0.1$ (nM))。

[0883] 実施例 122 : 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗細胞効果 (2)

HER2 抗原陽性細胞のヒト胃癌株である NCI — N87 (ATCC CRL-5822) は、10% のウシ胎児血清 (Hyclone) を含む RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific ; 以下、RPMI 培地) で培養した。HER2 抗原陽性細胞のヒト乳癌株である JIMT — 1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ ACC 589) は 10% のウシ胎児血清 (Hyclone) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific ; 以下、DMEM 培地) で培養した。NCI — N87 を RPMI 培地で 5.0×10^4 Cells/mL に、JIMT — 1 細胞を DMEM 培地で 1.3×10^4 Cells/mL になるように調製し、96 穴細胞培養用マイクロプレートに $80 \mu\text{L}$ ずつ添加し 37°C 、5% CO_2 下で一晩培養した。

翌日、RPMI 培地又は DMEM 培地で 400nM、80nM、16nM、3.2nM、0.64nM、0.13nM、0.026nM、0.0051nM、0.0010nM に希釈した抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲート ADC49、又は抗 LPS 抗体 - 薬物コンジュゲート ADC53 をマイクロプレートに $20 \mu\text{L}$ ずつ添加した。抗体 - 薬物コンジュゲート非添加ウェルには RPMI 培地又は DMEM 培地を $20 \mu\text{L}$ ずつ添加した。 37°C 、5% CO_2 下で 6 日間培養した。培養

後、マイクロプレートインキュベーターから取り出して室温で30分間静置した。培養液と等量のCellTiter — GLo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を添加してプレートミキサーで攪拌した。室温で10分間静置後にプレートリーダー (PerkinELmer) で発光量を計測した。

生細胞率は次式で算出した。

$$\text{生細胞率 (\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

a : 被験物質添加ウエルの発光量の平均値

b : 培地添加ウエルの発光量の平均値

IC₅₀値は次式で算出した。

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{anti-log} \left((50-d) \times (\text{LOG}_{10}(b) - \text{LOG}_{10}(a)) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}(b) \right)$$

a : 被験物質の濃度 a

b : 被験物質の濃度 b

c : 濃度 a の被験物質を添加した時の生細胞率

d : 濃度 b の被験物質を添加した時の生細胞率

a、b は生細胞率 50% を挟む2点で a>b 。

NCI _N87、JIMT— 1両細胞に対して抗HER2抗体-薬物コンジュゲートADC49は0.001<IC₅₀<0.1 (nM) の抗細胞効果を示した。一方、抗LPS抗体-薬物コンジュゲートADC53はいずれの細胞に対しても抗細胞効果を示さなかった (IC₅₀>0.1 (nM)) 。

[0884] 実施例 123 : 抗体-薬物コンジュゲートの抗細胞効果 (3)

CLDN6抗原陽性細胞のヒト卵巣癌株であるOV_90 (ATCC CRL-1 1732) は、15%のウシ胎児血清 (Hyclone) を含む、Medium 199 (Thermo Fisher Scientific) とMCDB 105 Medium (Sigma-Aldrich) の1対1混合培地 (以下、培地) で培養した。(OV_90細胞を培地で1.9×10⁴ cells/mLになるように調製し、96穴細胞培養用マイクロプレートに80 μL添加し37℃、5%CO₂下で一晩培養した。

翌日、培地で50 nM、10 nM、2.0 nM、400 pM、80 pM、16 pM、3.2 pM、0.64 pM、0.13 pMに希釈した抗CLDN6抗体-薬物コンジュゲートADC40、ADC41、ADC42

をマイクロプレートに20 μ Lずつ添加した。抗体 - 薬物コンジュゲート非添加ウェルには培地を20 μ Lずつ添加した。37℃、5%CO₂下で6日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出して室温で30分間静置した。培養液と等量のCellTiter — Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を添加してプレートミキサーで攪拌した。室温で10分間静置後にプレートリーダー (PerkinElmer) で発光量を計測した。

生細胞率は次式で算出した。

$$\text{生細胞率 (\%)} = a \div b \times 100$$

a : 被験物質添加ウェルの発光量の平均値

b : 培地添加ウェルの発光量の平均値

IC₅₀値は次式で算出した。

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{ant} - \log \left((50-d) \times (\text{LOG}_{10}(b) - \text{LOG}_{10}(a)) \div (d-c) + \text{LOG}_{10}(b) \right)$$

a : 被験物質の濃度 a

b : 被験物質の濃度 b

c : 濃度 a の被験物質を添加した時の生細胞率

d : 濃度 b の被験物質を添加した時の生細胞率

a、b は生細胞率 50% を挟む2点で a > b 。

0V—90細胞に対して抗CLDN6抗体 - 薬物コンジュゲートADC40、ADC41、ADC42は0.001 < IC₅₀ < 0.1 (nM) の抗細胞効果を示した。

[0885] 実施例 124 : 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (1)

マウス : 4—5週齢の雌BALB/cヌードマウス (日本チャールズ・リバー) を実験使用前にSPF条件下で4_7日間馴化した。マウスには滅菌した固形飼料 (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) を給餌し、滅菌した水道水 (5 - 15 ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製) を与えた。

測定・計算式 : 全ての研究において、腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルキャリパー (CD—15CX, Mitutoyo Corp.) で一週間に2—3回測定し、腫瘍体積 (mm³) を計算した。計算式は以下に示すとおり。

腫瘍体積 (mm³) = 長径 (mm) × [短径 (mm)]² × 1/2

抗体 - 薬物コンジュゲート及び抗体は全て 10 mM-Acetate Buffer, 5 % Sorbitol, pH5.5 (ナカライテスク株式会社 ;ABS 緩衝液) で希釈し、10 mL/kg の液量を尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS 緩衝液を同様に投与した。

NCI — N87 細胞 (ATCC CRL-5822) を生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場) に懸濁し、1 × 10⁷ cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day7 に無作為に群分けを実施した。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC26をDay7 に0.3 mgZkg の用量で、ADC19、又はADC54をDay7 に1 mgZkg の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS 緩衝液を同様に投与した。

結果を図4に示す。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC26、ADC19、乃至ADC54は腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。いずれの抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートを投与されたマウスにおいても、体重減少は認められなかった。

以下の抗腫瘍試験に関する評価例において、特に記載のない場合、本評価例で使用した手法で試験が実施されている。

[0886] 実施例125 :抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (2)

NCI — N87 細胞 (ATCC CRL-5822) をDulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich) に懸濁し、1 × 10⁷ cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day4 に無作為に群分けを実施した。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49、抗HER2抗体Trastuzumab (参考例3)、又は抗LPS抗体 - 薬物コンジュゲートADC53をDay4 に全て0.33 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS 緩衝液を同様に投与した。

結果を図5に示す。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49は腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。一方、抗HER2抗体Trastuzumab、抗LPS抗体 - 薬物コンジュゲートADC53では腫瘍の増殖を抑制しなかった。また、抗体

- 薬物コンジュゲートADC49、ADC53、又は抗HER2抗体投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0887] 実施例 126 : 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (3)

KPL-4細胞 (川崎医科大学・紅林淳一先生、British Journal of Cancer, (1999)79(5/6) : 707-717) を Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich) に懸濁し、 1.5×10^7 cells を雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day14 に無作為に群分けを実施した。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49、抗LPS抗体 - 薬物コンジュゲートADC53、又は Trastuzumab テシリン (参考例 1) を Day14 に 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) として ABS 緩衝液を同様に投与した。

結果を図6に示す。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49は腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。一方、ADC53、Trastuzumab テシリンでは腫瘍の退縮は認められなかった。また、ADC49、Trastuzumab テシリン投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0888] 実施例 127 : 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (4)

JIMT-1細胞 (DSMZ ACC 589) を生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場) に懸濁し、 5×10^6 cells を雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day10 に無作為に群分けを実施した。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49、又は Trastuzumab テシリン (参考例 1) を Day10 に 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) として ABS 緩衝液を同様に投与した。

結果を図7に示す。抗HER2抗体 - 薬物コンジュゲートADC49は腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。一方、Trastuzumab テシリンでは抗腫瘍効果が認められたが、腫瘍の退縮は認められなかった。また、ADC49、Trastuzumab テシリン投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0889] 実施例 128 : 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (5)

OV-90細胞 (ATCC CRL-11732) をマトリゲル (CORNING) に懸濁し、 2.5

$\times 10^6$ cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day 15に無作為に群分けを実施した。抗CLDN6抗体-薬物コンジュゲートADC40、又は抗CLDN6抗体 (H1L1) - テシリンをDay 15に0.33 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS緩衝液を同様に投与した。

結果を図8に示す。抗CLDN6抗体-薬物コンジュゲートADC40は腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。一方、抗CLDN6抗体 (H1L1) - テシリンでは、腫瘍の退縮は認められなかった。また、ADC40、H1L1-テシリン投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0890] 実施例 129 : 抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (6)

NIH : OVCAR-3細胞 (ATCC HTB-161) をマトリゲル (CORNING) に懸濁し、 1×10^7 cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day25に無作為に群分けを実施した。抗CLDN6抗体-薬物コンジュゲートADC40、又は抗CLDN6抗体 (H1L1) - テシリンをDay25に0.33 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS緩衝液を同様に投与した。

結果を図9に示す。抗CLDN6抗体-薬物コンジュゲートADC40は腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。一方、H1L1-テシリンでは抗腫瘍効果は認められたが、腫瘍の退縮は認められなかった。また、ADC40、H1L1-テシリン投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0891] 実施例 130 : 抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (7)

FaDu細胞 (ATCC HTB-43) を生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場) に懸濁し、 3×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day 10に無作為に群分けを実施した。抗TR0P2抗体-薬物コンジュゲートADC50、又は抗LPS抗体-薬物コンジュゲートADC53をDay 10に0.4 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS緩衝液を同様に投与した。

結果を図10に示す。抗TR0P2抗体-薬物コンジュゲートADC50は腫瘍の退縮

を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。一方、抗LPS抗体-薬物コンジュゲートA DC53は腫瘍の増殖を抑制しなかった。また、ADC50、ADC53投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0892] 実施例 131 : マウス抗CLDN6抗体B1産生ハイブリドーマ (218B1) 及びマウス抗CLDN6抗体C7産生ハイブリドーマ (218C7)

131- 1. マウスの免疫とハイブリドーマの取得

1- 1) マウス免疫に用いる細胞の準備

2 X 10⁶個もしくは5 X 10⁶個のN0R-P1細胞 (ヒト膵癌細胞株、RIKEN RCB-2139) をRPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) 10%FBS (ウシ胎児血清) (+) 培地 (10mLもしくは20mL) で5日間培養後に回収し、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で2回洗浄し、PBS (300 μ l) 中に再懸濁した。

1- 2) マウスへの免疫

BALB/c マウス (12週齢) に対し、1〜5回目の免疫は約1週間間隔でN0R-P1細胞 (2 X 10⁶個) を腹腔内へ免疫した。5回目の免疫より約2週間後にN0R-P1細胞 (5 X 10⁶個) を腹腔内へ免疫した。6回目の免疫より約3週間後にN0R-P1細胞 (2 X 10⁶個) を腹腔内へ免疫した。8〜10回目は約2週間間隔で2 X 10⁶個のN0R-P1細胞を腹腔内へ免疫した。10回目の約3週間後 (11回目) 及びその3日後 (12回目、最終免疫) では、5 X 10⁶個のN0R-P1細胞を腹腔内へ免疫した。脾臓細胞は最終免疫から3日後に摘出した。

1- 3) 免疫したマウスの脾臓細胞の準備

免疫済みマウスの脾臓を摘出し、すりつぶしてRPMI 1640 10%FBS (+) 培地に懸濁した。細胞懸濁液をセルストレイナー (70 μ m, BD Falcon 社) に通した後、1500 rpmで5分間、室温にて遠心して上清を廃棄した。Tris-NH₄Cl溶液 (20mM Tris-HCl pH7.2, 7.7. 6mM NH₄Cl ; 20mL) を加え、室温で5分間処理した。PBS (20mL) を加え、1500 rpmで5分間、室温にて遠心した。上清を廃棄した後に、RPMI 1640 FBS (+) 培地 (10mL) を加えた。

1- 4) ミエローマ細胞の準備

P3U1細胞 (マウスミエローマ細胞株) をRPMI 1640 FBS (+) 培地で5日間

培養した後に回収し、RPMI1 640 FBS (+) 培地 (20m L) に再懸濁した。

1-5) 細胞融合

脾臓細胞とミエローマ細胞を5 :1になるように混合し、1500rpm で5分間、室温にて遠心した。RPMI1 640 FBS (-) 培地 (10mL) で2回洗浄した後に、遠心分離 (1500rpm 、5分間) した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、ポリエチレングリコール—1500 (PEG—1500 ;1ml) を約1分かけて徐々に加えた。3分30秒間攪拌した後に、30秒間室温で静置した。その後、該細胞液に1分かけてRPMI 培地 10%Low IgG FBS (+) (10ml) を加えた。該細胞懸濁液を遠心分離 (1500rpm 、5分間) し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、HAT培地 (10%Low IgG FBS、HAT Media Supplement, 5%Br iC Lone を含むRPMI1 640 培地 ;200m L) 中にゆるやかに懸濁した。該懸濁液を96ウエル培養用プレートに200 μ l/ウエルずつ分注し、37℃、5% CO₂のインキュベーター中で、6日間培養した。

1-6) ハイブリドーマのスクリーニング・プロープの準備

抗体の内在化及びイムノトキシン活性の測定を目的にリコンビナント複合蛋白質であるDT3Cを作製した。このDT3Cは、ジフテリア毒素 (DT) の触媒領域と連鎖球菌プロテインGの抗体結合領域を遺伝子工学的に融合させた蛋白質である。DT3Cは抗体のFc部分に特異的に結合し、細胞内へ取り込まれると蛋白質合成阻害により細胞死を誘導する。この系を用いることで抗体の内在化とイムノトキシンによる殺細胞効果を同時に観察することができる (Yamaguchi, M. et al, Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603)。

1-7) DT3C によるハイブリドーマのスクリーニング

96ウエルプレートに4 μ g/mLのDT3C (25 μ l) を加え、さらに工程1—5で取得されたハイブリドーマの培養上清 (25 μ l) を加え、室温で30分インキュベーションした。2 $\times$ 10⁵個/れ (RPMI培地 10%Low IgG FBS (+)) のNOR—P1細胞 (50 μ l) を播種し、37℃ CO₂インキュベーターで3日間培養した。培養後の顕微鏡観察により、陰性対照抗体を用いた際の付着細胞数の約25%以

下の付着細胞数を示したウエルを陽性と判定した。選抜したクローンは1〜2回サブクローニングを行い、モノクローナルなハイブリドーマ細胞株8株を樹立した。

[0893] 131-2 : ハイブリドーマの産生する抗体の結合する抗原の同定

実施例 131_1において調製されたハイブリドーマの産生する抗体のうち2つのクローン218B1及び218C7について抗原の同定を行った。

2-1) ピオチンラベルした細胞表面蛋白質の218B1抗体及び218C7抗体を用いた免疫沈降

2 X 10⁶個の NTERA-2細胞 (ヒト精巣癌細胞株、ATCC CRL-1973) の培養上清を除去し、PBSで2回洗浄した。EZ_Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社) を0.1mg/mLの濃度でPBSに懸濁した。PBSを除去した後、Biotin/PBS溶液を加え、30分間振盪器上でインキュベーションした後、100mMグリシン/PBS溶液 (25mL) で2回洗浄し、その後、PBS (10mL) で1回洗浄した。洗浄後の細胞を200μLの溶解バッファー (150mM NaCl、50mM Tris-HCl pH7.4、1%DDM、Protease inhibitor、Complete EDTA free (Roche 社) 1粒/50mL) 中に再懸濁し、4℃で30分間処理した。遠心分離 (13000rpm、20分間、4℃) して細胞溶解液を調製した。Protein G Sepharose (Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare 社)) のバッファーを溶解バッファーに置換して得られたProtein G Sepharose/溶解バッファー (50%スラリー; 30μL) を細胞溶解液に加え、4℃で30分間ローテートした後、4℃で1分間遠心し、上清を回収した。この上清に218B1抗体あるいは218C7抗体 (約3μg) を加え、4℃で30分間ローテートした後、Protein G Sepharose/溶解バッファー (50%スラリー; 60μL) を加え、4℃で1時間ローテートした。溶解バッファー (1mL) でProtein G Sepharose を6回洗浄した後、1XSDS サンプルバッファー (BioRad 社) に再懸濁した。100℃で5分間懸濁液を処理した後、溶液を回収し、SDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) のためのサンプルとした。

2-2) SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

2- 1) で調製したSDS—PAGEサンプルをSuperSep Ace 5-20% (Wako 社) を用いて、50mVで30分間スタッキングした後に、200mVで1時間泳動した後、ゲルよりメンブレンへ12mVで47分間プロッティングした。メンブレンをPBST (PBS (-) - 0.02% Tween 20) で洗浄した後、1時間ブロッキングを行った。メンブレンをPBSTで5分間3回洗浄した後にStreptavidin-horseradish peroxidase conjugate (GE Healthcare社; PBSTで2000倍に希釈して使用) と1時間反応させた。メンブレンをPBSTで5分間2回洗浄した後に、目的のバンドをenhanced chemiluminescence (ECL) 法を用いて検出した。218B1抗体及び218C7抗体を用いたいずれの場合においても、DTTの添加の有無によらず分子量18kDaのバンドが検出された。

2- 3) 細胞蛋白質の218B1抗体及び218C7抗体を用いた免疫沈降産物の質量分析

2×10^7 個のNTERA—2細胞を回収し、PBSで2回洗浄した。セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、1500 rpm、5分間遠心した。上清を除去した後に2mLの溶解バッファー中に再懸濁し、4℃で30分間処理した。遠心分離 (13000 rpm、20分間、4℃) して細胞溶解液を調製した。Protein G Sepharose/ 溶解バッファー (50%スラリー; 180 μ l) を細胞溶解液に加え、4℃で30分間ローテートした後に4℃で1分間遠心し、上清を回収した。この上清に218B1抗体 (約9 μ g) を加え、4℃で30分間ローテートした後にProtein G Sepharose/ 溶解バッファー (50%スラリー; 180 μ l) を加え、4℃で1時間ローテートした。溶解バッファー (1ml) でProtein G Sepharoseを6回洗浄した後に1X SDSサンプルバッファーに再懸濁した。100℃で5分間懸濁液を処理した後、溶液を回収し、SDS—PAGEのためのサンプルとした。2—2) と同様の方法でSDS—PAGEを行い、泳動ゲルをCBB染色した。泳動ゲルより18kDaに相当する部分を切り出し、質量分析に供した。質量分析の結果、該ゲル片はClaudin—6を含むことが判明した。

2- 4) FACS解析

質量分析から218B1抗体及び218C7抗体の抗原がClaudin—6であることが予

測できたため、cDNAの遺伝子導入による強制発現解析を行った。FACS解析の結果、ヒト(Uaudi n_6 発現 CHO—K1細胞では218B1抗体及び218C7抗体は強陽性反応を示したため、218B1抗体及び218C7抗体の抗原はClaudi n_6 であることが示された。

[0894] 実施例 132 : ハイブリドーマ培養上清からの抗体の精製

実施例 131で作製したマウス抗CLDN6抗体B1産生ハイブリドーマ (218B1) 及びマウス抗CLDN6抗体C7産生ハイブリドーマ (218C7) を、10%のFetal Bovine Serum, Ultra-Low IgG (Thermo Fisher Scientific) を含むHybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific) で培養した。培養上清を遠心により回収し、0.45 µmのフィルター (Corning社製) でろ過した。rProtein Aアフィニティークロマトグラフィー (4〜6℃下) 1段階工程で、培養上清から抗体を精製した。rProtein Aアフィニティークロマトグラフィー精製後のバッファー置換工程は4〜6℃下で実施した。最初に培養上清をPBSで平衡化したMa bSelectSuRe (GE Healthcare Bioscience 社製) が充填されたカラムにアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、カラム容量2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2M アルギニン塩酸塩溶液 (pH4.0) で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) によりPBS (-) への液置換を行った。最後はCentrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量UF10K, Sartorius社, 4℃下) にて濃縮し、IgG濃度を1 mg/mL以上に調製した。Minisart-Plus filter (Sartorius社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0895] 実施例 133 : マウス抗CLDN6抗体B1及びC7のin vitro評価

133-1 : フローサイトメトリーによるマウス抗CLDN6抗体の結合能評価

実施例 132で作製したマウス抗CLDN6抗体のヒトCLDN6及びファミリー分子CLDN3、CLDN4、CLDN9結合性をフローサイトメトリー法により評価した。Origene社より購入したhuman CLDN3/pCMV6-Entry, human CLDN4/pCMV6-Entry, human CLDN6/pCMV6-Entry, human CLDN9/pCMV6-Entry, またはpCMV6-Entryを、293T細胞 (Thermo Fisher Scientific HCL4517) に

Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて一過性に導入し、37℃、5% CO₂の条件下で一晩培養した後、細胞懸濁液を調製した。遺伝子導入した293T細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、マウス抗CLDN6抗体（クローン番号はB1、C7）、又はマウスIgG1コントロール抗体（R&D Systems）を終濃度30 μg/mL、10 μg/mL、3.3 μg/mL、1.1 μg/mLで加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5%のウシ胎児血清（Hyclone）を含むDulbecco's phosphate buffered saline（Sigma-Aldrich）（以下、5%FBS含有PBS）で2回洗浄した後、5%FBS含有PBSで500倍希釈したFLUORESCIN-CONJUGATED GOAT IGG FRACTION TO MOUSE IGG (WHOLE MOLECULE) (MP BIOMEDICALS)を加えて懸濁し、4℃で1時間静置した。5%FBS含有PBSで2回洗浄した後、フローサイトメーター（FC500; Beckman Coulter）で検出を行った。データ解析はFlowJo (TreeStar)で行った。なお、各遺伝子導入の確認は、細胞を0.25%Tween20含有PBSで透過処理した後にマウス抗FLAG抗体（Sigma-Aldrich）を用いて行った。結果を図40に示す。図40のグラフにおいて、縦軸は抗体結合量を表すFITCの蛍光強度、横軸は抗体濃度を示す。作製したマウス抗CLDN6抗体はヒトCLDN6とヒトCLDN9に同程度に結合し、ヒトCLDN3、ヒトCLDN4には結合しなかった。マウスコントロールIgG1はいずれの細胞にも結合しなかった。

[0896] 133-2 :抗体内在化活性

マウス抗CLDN6抗体B1およびC7の内在化活性は、蛋白質合成を阻害する毒素（サポリン）を結合させた抗マウスIgG試薬Mab_ZAP (ADVANCED TARGETING SYSTEMS)を用いて評価した。この評価では、マウス抗CLDN6抗体の内在化活性に依存してMab_ZAPが細胞内に取り込まれ、蛋白質合成を阻害するサポリンが細胞内に放出されることで、細胞増殖が抑制される。

ヒトCLDN6陽性細胞のヒト絨毛癌株であるJEG-3(ATCC HTB-36)、ヒトCLDN6陽性細胞のヒト卵巣癌株であるNIH :OVCA-3 (ATCC HTB-161)、又はヒトCLDN6陰性細胞のヒト膵臓癌株であるBxPC_3 (ATCC CRL-1687)を2x10³ cells/wellはで96穴細胞培養用マイクロプレートに播種して37℃、5% CO₂の条件下

で一晩培養した。翌日、マウス抗CLDN6抗体、又はマウスIgG1抗体（R&D Systems）を終濃度1nMとなるように、Mab-ZAP（終濃度:0.5 nM）、又は毒素を結合してしなしAffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific（Jackson ImmunoResearch）（終濃度:0.5 nM）と混合した混合溶液を添加して、37℃、5% CO₂の条件下で5日間培養した。生存細胞数は、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（Promega）を用いたATP活性の定量で測定した。抗CLDN6抗体添加による細胞増殖抑制作用は、混合溶液非添加ウェルの値を100%とする相対生存率で求めた。図41に結果を示す。マウス抗CLDN6抗体（B1、C7）はヒトCLDN6陽性細胞株JEG-3とNHH:OVCA8-3に対して細胞増殖抑制効果を認めた。一方、ヒトCLDN6陰性細胞株BxPC-3に対しては細胞増殖抑制効果を認めなかった。また、マウスIgG1抗体はいずれの細胞株に対しても細胞増殖抑制効果を認めなかった。この結果、作製した抗CLDN6抗体（B1、C7）は内在化活性を有し、抗体-薬物コンjugate用の抗体として適すると考えられる。

[0897] 実施例 134 :マウス抗CLDN6抗体B1及びC7の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

134- 1 :B1抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

134- 1- 1 :B1抗体産生ハイブリドーマのtotal RNAの調製

B1抗体の可変領域をコードするcDNAを増幅するため、B1抗体産生ハイブリドーマよりTRIzol Reagent（Ambion社）を用いてtotal RNAを調製した。

134- 1- 2 :5' -RACE PCRによるB1抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAの増幅と配列の決定

軽鎖可変領域をコードするcDNAの増幅は、実施例 134- 1- 1で調製したtotal RNAの約1μgとSMARTer RACE 5' /3' Kit（CLontech社）を用いて実施した。B1抗体の軽鎖遺伝子の可変領域をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM（Universal Primer Mix :SMARTer RACE 5' /3' Kitに付属）、及び公知のマウス軽鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

5' -RACE PCRで増幅した軽鎖の可変領域をコードするcDNAをプラスミドにクローニングし、次に軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。

決定されたB1抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号18に示し、アミノ酸配列を配列番号19に示す。

134- 1- 3 :5' -RACE PCRによるB1抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAの増幅と配列の決定

重鎖可変領域をコードするcDNAの増幅は、実施例134—1_1で調製したtotal RNAの約1 μ gとSMARTer RACE 5' /3' Kit (CLontech 社)を用いて実施した。LB1抗体の重鎖遺伝子の可変領域をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix :SMARTer RACE 5' /3' Kitに付属)、及び公知のマウス重鎖の定常領域の配列から設計したプライマーを用いた。

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

決定されたB1抗体の重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号20に示し、アミノ酸配列を配列番号21に示す。

134- 2 :C7抗体の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

実施例134—1と同様の方法で実施した。決定されたC7抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号22に示し、アミノ酸配列を配列番号23に示す。重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号24に示し、アミノ酸配列を配列番号25に示す。

[0898] 実施例135：キメラ化抗CLDN6抗体chB1の作製

135- 1 :キメラ化抗CLDN6抗体chB1の発現ベクターの構築

135- 1- 1 :キメラ化及びヒト化軽鎖発現ベクターPCMA _ LKの構築

プラスミドpcDNA3. 3-TOP0/LacZ (Invitrogen 社)を制限酵素XbaI及びPmeIで消化して得られる約5. 4kbのフラグメントと、配列番号26に示すヒト軽

鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片をIn-Fusion HD PCRクローニングキット (c Lontech 社) を用いて結合して、pcDNA3. 3/LK を作製した。pcDNA3. 3/LK からネオマイシン発現ユニットを除去することによりpCMA_LKを構築した。

135- 1- 2 :キメラ化及びヒト化IgG1 LALA タイプ重鎖発現ベクターpCMA_G1

LALA の構築

pCMA_LK をXbaI 及びPmeI で消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたDNA断片と、配列番号27で示されるヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1 LALA 定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片をIn-Fusion HD PCRクローニングキット (c Lontech 社) を用いて結合して、pCMA_G1 LALA を構築した。

135- 1- 3 :キメラ化chB1 重鎖発現ベクターの構築

配列番号33に示すchB1 重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット (c Lontech 社) を用いて、pCMA_G1 LALA を制限酵素BspI で切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することによりchB1 重鎖発現ベクターを構築した。chB1 重鎖のアミノ酸配列を配列番号32に示す。

135- 1- 4 :キメラ化chB1軽鎖発現ベクターの構築

配列番号29に示すchB1軽鎖をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した (GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット (c Lontech 社) を用いて、合成したDNA断片とpCMA_LK をXbaI 及びPmeI で消化して軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域を取り除いたDNA断片を結合することにより、chB1 軽鎖発現ベクターを構築した。chB1 軽鎖のアミノ酸配列を配列番号28に示す。

135-2 :キメラ化抗CLDN6抗体chB1 の生産及び精製

135-2- 1 :キメラ化抗体chB1 の生産

FreeStyle 293F 細胞 (Invitrogen 社) はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の1.2×10⁹個のFreeStyle 293F 細胞 (Invitrogen 社

) を 3L Fernbach Erlenmeyer Flask(CORNING 社)に播種し、FreeStyle Le293 expression medium (Invitrogen 社) で希釈して 2.0×10^6 細胞/mL に調製した。40 mL の Opti-Pro SFM 培地 (Invitrogen 社) に 0.24mg の重鎖発現ベクターと 0.36 mg の軽鎖発現ベクターと 1.8 mg の Polyethyleneimine (Polysciences #24765) を加えて穏やかに攪拌し、さらに 5 分間放置した後に FreeStyle 293F 細胞に添加した。37℃、8%CO₂ インキュベーターで 4 時間、90rpm で振とう培養後に 600 mL の EX-CELL VPR0 培地 (SAFC Biosciences 社)、18 mL の (UtaMAX I (GIBCO 社)、及び 30 mL の Yeastolite Ultra 1U rate (GIBCO 社) を添加し、37℃、8%CO₂ インキュベーターで 7 日間、90rpm で振とう培養して得られた培養上清を Disposable Capsule Filter (Advantec #CCS_045_E1 H) でろ過した。取得したキメラ化抗 CLDN6 抗体を「chB1」と命名した。

135- 2-2 : キメラ化抗体 chB1 の精製

実施例 135_ 2_ 1 で得られた培養上清から抗体を rProtein A アフィニティークロマトグラフィーの 1 段階工程で精製した。培養上清を PBS で平衡化した MabSelectSuRe が充填されたカラム (GE Healthcare Bioscience 社製) にアプライしたのちに、カラム容量の 2 倍以上の PBS でカラムを洗浄した。次に 2M アルギニン塩酸塩溶液 (pH4.0) で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific 社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) により PBS (-) へのバッファー置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量 UF10K, Sartorius 社) で抗体を濃縮し、IgG 濃度を 1mg/mL 以上に調製した。最後に Minisart-P Plus filter (Sartorius 社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0899] 実施例 136 : ヒト化抗 CLDN6 抗体の作製

136- 1 : 抗 CLDN6 抗体のヒト化体デザイン

136- 1- 1 : キメラ化抗体 chB1 の可変領域の分子モデリング

chB1 の可変領域の分子モデリングは、ホモロジーモデリングとして公知の方法 (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)) を利用した。chB1 の重

鎖と軽鎖の可変領域に対して高い配列同一性を有するProtein Data Bank(Nucleic Acid Res. 35, 0301-0303(2007))に登録されている構造(PDB ID: 1XIW)を表型に、市販の蛋白質立体構造解析プログラムBioLuminate (Schrodinger社製)を用いて行った。

136-1-2 : ヒト化アミノ酸配列の設計

chB1は、CDRグラフティング(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989))によりヒト化した。Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))において既定されるヒトのgamma鎖サブグループ1およびkappa鎖サブグループ1のコンセンサス配列が、chB1のフレームワーク領域に対して高い同一性を有することから、それぞれ、重鎖と軽鎖のアクセプターとして選択された。アクセプター上に移入すべきドナー残基は、Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989))によって与えられる基準などを参考に三次元モデルを分析することで選択された。なお、CDRL3が疎水的なアミノ酸に富んでいたため、CDRL3に変異を導入したヒト化軽鎖も設計した。

136-2 : chB1 重鎖のヒト化

設計された3種の重鎖をhH1、hH2及びhH3と命名した。hH1の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号52(図34)に記載する。配列番号52のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号53(図34)に記載する。hH2の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号56(図36)に記載する。配列番号56のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号57(図36)に記載する。hH3の重鎖全長アミノ酸配列を、配列番号60(図38)に記載する。配列番号60のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号61(図38)に記載する。

実施例135で示されるヒトキメラ化抗CLDN6抗体chB1-H、ヒト化抗体重鎖hH1、hH2、及びhH3のアミノ酸配列の比較を図45に示す。hH1、hH2及びhH3の配列において「・」はchB1-Hと同一のアミノ酸残基を示し、

アミノ酸残基が記載されている箇所は置換されたアミノ酸残基を示す。

136-3 : chB 1軽鎖のヒト化

設計された4種の軽鎖をhL1、hL2、hL3及びhL4と命名した。hL1の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号36(図26)に記載する。配列番号36のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号37(図26)に記載する。hL2の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号40(図28)に記載する。配列番号40のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号41(図28)に記載する。hL3の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号44(図30)に記載する。配列番号44のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列番号45(図30)に記載する。hL4の軽鎖全長アミノ酸配列を、配列番号48(図32)に記載する。配列番号48のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、配列番号49(図32)に記載する。

実施例135で示されるヒトキメラ化抗CLDN6抗体chB 1の軽鎖であるchB 1—ヒト化抗体軽鎖hL1、hL2、hL3及びhL4のアミノ酸配列の比較を図46に示す。hL1、hL2、hL3及びhL4の配列において、「・」はchB 1—Lと同一のアミノ酸残基を示し、アミノ酸残基が記載されている箇所は置換されたアミノ酸残基を示す。

136-4 : 軽鎖の組み合わせによるヒト化抗体の本設計

hH1及びhL1からなる抗体を「H1L1抗体」又は「H1L1」と称する。hH2及びhL2からなる抗体を「H2L2抗体」又は「H2L2」と称する。hH1及びhL3からなる抗体を「H1L3抗体」又は「H1L3」と称する。hH2及びhL4からなる抗体を「H2L4抗体」又は「H2L4」と称する。hH3及びhL3からなる抗体を「H3L3抗体」又は「H3L3」と称する。

136-5 : ヒト化抗CLDN6抗体の作製

136-5-1 : ヒト化重鎖発現ベクターの構築

136-5-1-1 : hH1発現ベクターの構築

配列番号53に示すhH1のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した(GENEART社)。実施例135_1_3と同様の方法で

hH1発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 1 - 2 : hH2 発現ベクターの構築

配列番号57に示すhH2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。実施例135_1_3と同様の方法でhH2発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 1 - 3 : hH3 発現ベクターの構築

配列番号61に示すhH2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至440に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。実施例135_1_3と同様の方法でhH3発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 2 : ヒト化軽鎖発現ベクターの構築

136 - 5 - 2 - 1 : hL1発現ベクターの構築

配列番号37に示すhL1のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。In-Fusion HD PCRクローニングキット (Clontech社)を用いて、pCMA_LKを制限酵素BsiWIで切断した箇所に合成したDNA断片を挿入することによりhL1発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 2 - 2 : hL2 発現ベクターの構築

配列番号41に示すhL2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。実施例136_5_2_1と同様の方法でhL2発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 2 - 3 : hL3 発現ベクターの構築

配列番号45に示すhL3のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。実施例136_5_2_1と同様の方法でhL3発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 2 - 4 : hL4 発現ベクターの構築

配列番号49に示すhL4のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した (GENEART社)。実施例136_5_2_1と同様の方法でhL4発現ベクターを構築した。

136 - 5 - 3 : ヒト化抗体の調製

136-5-3- 1 : ヒト化抗体 H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、及び H3L3 の生産

実施例 135_2_ 1 と同様の方法で生産した。実施例 136—4 に示した重鎖と軽鎖の組み合わせに対応する重鎖発現ベクターと軽鎖発現ベクターの組み合わせにより、H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、及び H3L3 を生産した。

136-5-3-2 : ヒト化抗体 H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、及び H3L3 の 2step 精製

実施例 136_5_3_1 で得られた培養上清を rProtein A アフィニティークロマトグラフィーとセラミックハイドロキシアパタイトの 2 段階工程で精製した。培養上清を PBS で平衡化した MabSelectSuRe が充填されたカラム (GE Healthcare Bioscience 社製) にアプライした後に、カラム容量の 2 倍以上の PBS でカラムを洗浄した。次に 2M アルギニン塩酸塩溶液 (pH4.0) で抗体を溶出した。抗体の含まれる画分を透析 (Thermo Scientific 社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) により PBS へのバッファー置換を行い、5mM リン酸ナトリウム / 50mM MES/pH7.0 のバッファーで 5 倍希釈した後に、5mM NaPi / 50mM MES/30mM NaCl/pH7.0 のバッファーで平衡化したセラミックハイドロキシアパタイトカラム (日本バイオラッド、Bio-Scale CHT Type-1 Hydroxyapatite Column) にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific 社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) により HBSor (25mM ヒスチジン / 5% ソルビトール、pH6.0) へのバッファー置換を行った。Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20 (分画分子量 UF10K, Sartorius 社) にて抗体を濃縮し、IgG 濃度を 50mg/mL に調製した。最後に Minisart-P Plus filter (Sartorius 社) でろ過し、精製サンプルとした。

[0900] 実施例 137 : フローサイトメトリーによるヒト化抗 CLDN6 抗体の結合能評価

実施例 136 で作製したヒト化抗 CLDN6 抗体のヒト CLDN6 及びファミリー分子 CLDN3、CLDN4、CLDN9 結合性をフローサイトメトリー法により評価した。実施例 133—1 と同様の手法にて一過性に遺伝子導入した 293T 細胞を使用した。

ヒト CLDN6 又はヒト CLDN9 遺伝子を導入した細胞には、ヒト化抗 CLDN6 抗体 H1L1

、H2L2、H1L3、H2L4、及びH3L3、又はヒトIgG1コントロール抗体（CALBIOCHEM）を終濃度100nM、20nM、4nM、0.8nMで加えて懸濁し、4℃で30分静置した。ヒトCLDN3、ヒトCLDN4遺伝子、又は空のベクターを導入した細胞には、ヒト化抗CLDN6抗体H1L1、H2L2、H1L3、H2L4、及びH3L3を終濃度100nMで加えて懸濁し、4℃で30分静置した。5%のウシ胎児血清（Hyclone）を含むDulbecco's phosphate buffered saline（Sigma-Aldrich）（以下、5%FBS含有PBS）で洗浄した後、5%FBS含有PBSで150倍希釈したFITC AffiniPureF（ab'）Z Fragment Goat Anti-Human IgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch）を加えて懸濁し、4℃で30分静置した。5%FBS含有PBSで洗浄した後、フローサイトメーター（FC500；Beckman Coulter）で検出を行った。データ解析はFlowJo（TreeStar）で行い、抗体の結合量を示すFITCの平均蛍光強度（MFI）を算出した。結果を図42に示す。図42のグラフにおいて、横軸は抗体濃度、縦軸はMFIを示す。作製したヒト化抗CLDN6抗体はヒトCLDN6とヒトCLDN9に同程度に結合し、ヒトCLDN3、ヒトCLDN4には結合しなかった。ヒトコントロールIgG1はいずれの細胞にも結合しなかった。

[0901] 実施例 138 :Trastuzumab 変異体の作製

138-1 :Trastuzumab_LALA の重鎖発現ベクターの構築

配列番号74に示すTrastuzumab_LALA の重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至434に示されるDNA断片を合成した（GENEART社）。実施例135_1_3と同様の方法で発現ベクターを構築した。Trastuzumab —LALA の重鎖のアミノ酸配列を配列番号75に示す。

138-2 :Trastuzumab —LALA の軽鎖発現ベクターの構築

配列番号72に示すTrastuzumab —LALA の軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号37乃至402に示されるDNA断片を合成した（GENEART社）。実施例136_5_2_1と同様の方法で発現ベクターを構築した。Trastuzumab —LALA の軽鎖のアミノ酸配列を配列番号73に示す。

138-3 :Trastuzumab 変異体の生産

実施例135_2_1と同様の方法で生産した。

138-4 : Trastuzumab 変異体の精製

実施例 138-3 で得られた培養上清から実施例 135-2-2 と同様の方法で Trastuzumab - LALA を精製した。ただし、PBS (-) ではなく 50mM リン酸緩衝溶液 (pH6.0) へのバッファー置換を行った。

[0902] 実施例 139 : 糖鎖変換 (Trastuzumab 変異体 - MSG1)

工程 1 : (Fuc α 1,6) GLcNAc - Trastuzumab 変異体

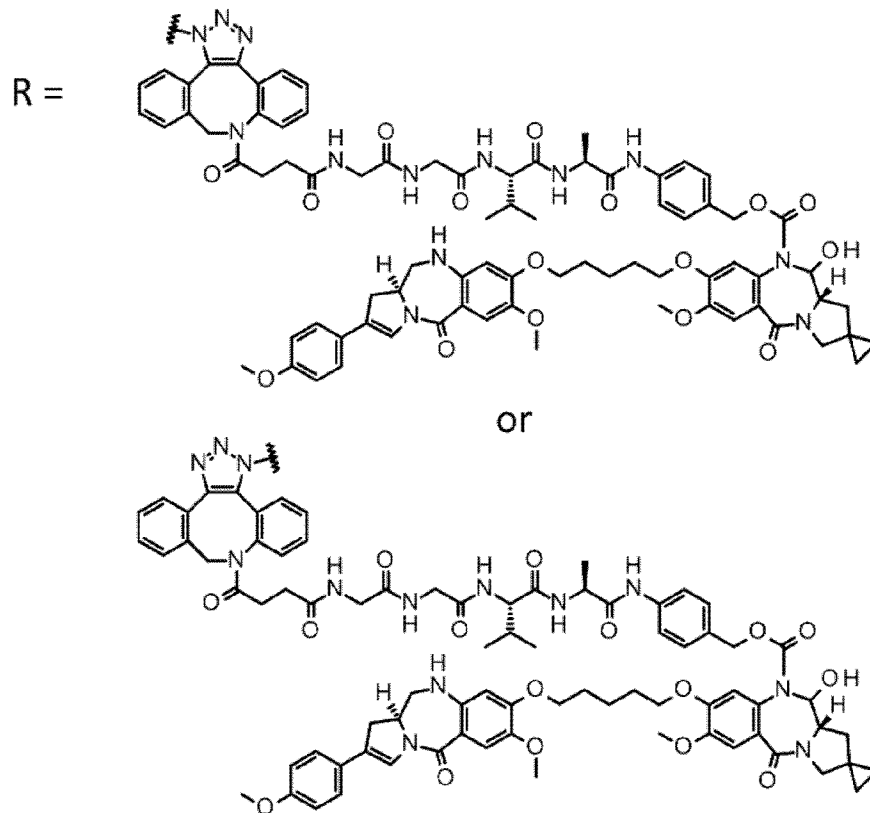
実施例 138 で調整した Trastuzumab 変異体溶液 ca. 22.3mg/ml (50mM リン酸緩衝液 (pH6.0)) (2.7ml) を用いて、実施例 58 工程 1 と同様の操作を行い、6.1mg/ml の (Fuc α 1,6) GLcNAc - Trastuzumab 変異体溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6.0)) (6.1mL) を得た。

[0903] 工程 2 : Trastuzumab 変異体 - [MSG1-N₃]₂

上記工程 1 で得られた 6.1mg/ml (Fuc α 1,6) GLcNAc-Trastuzumab 変異体溶液 (50mM リン酸緩衝液 (pH6.0)) (6.1ml) を用いて、実施例 60 工程 1 と同様の操作を行うことによって、10.2mg/ml Trastuzumab 変異体 - [MSG1-N₃]₂ 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0)) (3.7ml) を得た。

[0904] 実施例 140 : ADC55

[化 248]



(工程 1 で得られる化合物は、上記式で示すように トリアゾール環幾何異性体を有し、実施例 140 工程 1 で得られた化合物は上記 R として示した 2 種類の構造からなるリンカーを混合して保持する。)

工程 1 : 抗体と薬物 リンカーのコンジュゲーション

実施例 139 工程 2 にて得られた抗体のリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (10.2mg/mL, 0.40mL) に、室温にてリン酸緩衝生理食塩水 (pH6.0) 溶液 (0.40mL) 1, 2-プロパンジオール (0.767mL)、ジメチルホルムアミド (0.20mL)、実施例 3 工程 13 にて得られた化合物を 10mM 含むジメチルホルムアミド溶液 (0.033mL; 抗体 1 分子に対して 12 当量) を加え、チューブローター (MTR-103、アズワン株式会社) を用いて、室温にて 48 時間反応させた。

精製操作 : 上記溶液を共通操作 D を用いて精製を行い、目的の化合物を有する溶液を 7.00mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E、F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 0.39mg/mL, 抗体収量 : 1.38mg (35%), 抗体一分子あたりの
薬物平均結合数 (n) : 1.8

[0905] 実施例 141 : 抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗細胞効果

HER2 抗原陽性細胞のヒト乳癌株である KPL-4 細胞 (川崎医科大学・紅林
淳一先生) を、10% のウシ胎児血清 (HyClone) を含む RPMI 1640 Medium (Thermo
Fisher Scientific; 以下、RPMI 培地) で 6.25×10^3 cells/mL に
なるように調製し、96 穴細胞培養用マイクロプレートに 80 μ L ずつ添加した。
細胞添加後、37℃、5%CO₂ 下で一晩培養した。

翌日、RPMI 培地で 100 nM、20 nM、4 nM、0.8 nM、0.16 nM、0.032 nM、
6.4 pM、1.3 pM、0.26 pM に希釈した抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲートを
マイクロプレートに 20 μ L ずつ添加した。抗体 - 薬物コンジュゲート非添加
ウェルには RPMI 培地を 20 μ L ずつ添加した。KPL-4 は 37℃、5%CO₂ 下で 6 日間培
養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出して室温
で 30 分間静置した。培養液と等量の Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay
(Promega) を添加してプレートミキサーで攪拌した。室温
で 10 分間静置後にプレートリーダー (PerkinElmer) で発光量を計測した。
生細胞率は実施例 123 と同様の方法にて算出した。

KPL-4 細胞に対して抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲート ADC49 及び ADC55 はい
ずれも $0.001 < IC_{50} < 0.01$ (nM) の抗細胞効果を示した。

[0906] 実施例 142 : 抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍試験 (1)

実施例 124 と同様の実験動物及び手法を用いて、抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュ
ゲートの抗腫瘍の抗腫瘍効果を測定した。

KPL-4 細胞 (川崎医科大学・紅林淳一先生) を Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich) に懸濁し、 1.5×10^7 cells を雌ヌード
マウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day14 に無作為に群分けを実施した。
抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲート ADC49、又は抗 HER2 抗体 - 薬物コンジュゲ
ート ADC55 を Day14 に 0.33 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、コント
ロール群 (Vehicle 群) として ABS 緩衝液を同様に投与した。

結果を図47に示す。ADC49 とADC55 はいずれも0.33 mg/kg 投与で、同等の抗腫瘍活性を示した。また、ADC49、ADC55 投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0907] 実施例 143 : 抗 HER2 抗体 - 薬物 コンジュゲートの抗腫瘍試験 (2)

JIMT-1細胞 (DSMZ ACC 589) を生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場) に懸濁し、 5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day 11に無作為に群分けを実施した。ADC55 をDay 11に0.4 mg/kg または0.2 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS緩衝液を同様に投与した。

結果を図48に示す。ADC55 は0.4 mg/kg 投与時に腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果を認めた。また、いずれの投与用量においてもADC55 投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

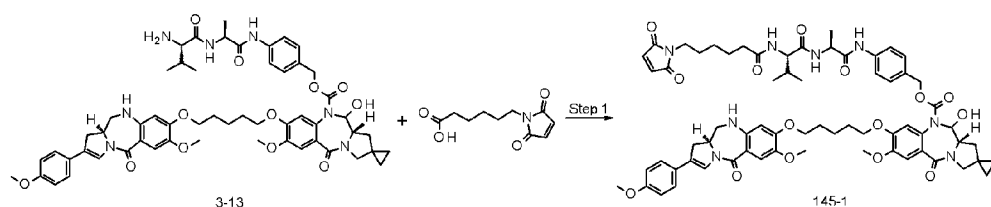
[0908] 実施例 144 : 抗 HER2 抗体 - 薬物 コンジュゲートの抗腫瘍試験 (3)

CFPAC-1細胞 (ATCC CRL-1918) を生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場) に懸濁し、 5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右体側部に皮下移植し (Day0)、Day 10に無作為に群分けを実施した。抗 HER2 抗体 - 薬物 コンジュゲートADC49、ADC55 又は抗 LPS 抗体 - 薬物 コンジュゲートADC53 をDay 10に0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。また、コントロール群 (Vehicle群) としてABS緩衝液を同様に投与した。

結果を図49に示す。ADC49 とADC55 いずれを投与したマウスにおいても、腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果が認められた。また、ADC49、ADC55、又はADC53投与によるマウスの体重減少は認められなかった。

[0909] 実施例 145 : 薬物 リンカー 43

[化 249]



実施例3工程12で得られる化合物(0.047g, 0.046mmol)と市販のN-[6-(2,5-ジ
オキノ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリニルグリシ

ン(0.016g, 0.050mmol)を実施例145と同様に反応させ、目的化合物(30mg, 50%)を得た。

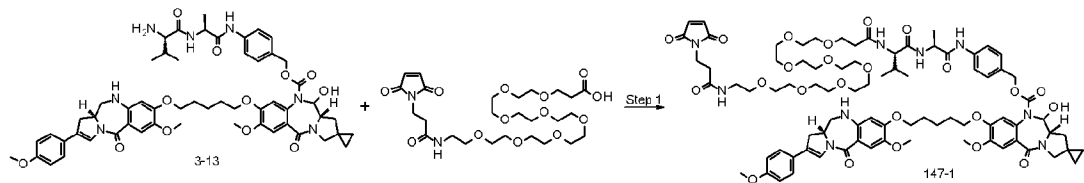
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- D_6) δ : 9.92(1H, s), 8.23(1H, d, $J=6.7\text{Hz}$), 8.12–8.02(2H, m), 7.84(1H, d, $J=9.1\text{Hz}$), 7.65–7.50(2H, m), 7.45(1H, s), 7.38(2H, d, $J=9.1\text{Hz}$), 7.30(1H, s), 7.26–7.16(2H, m), 7.10–7.02(1H, m), 7.00(2H, s), 6.91(2H, d, $J=9.1\text{Hz}$), 6.82–6.67(1H, m), 6.62–6.48(2H, m), 6.31(1H, s), 5.80–5.72(1H, m), 5.25–5.15(1H, m), 4.85–4.77(1H, m), 4.43–4.30(1H, m), 4.25–4.14(2H, m), 4.06–3.87(3H, m), 3.86–3.71(6H, m), 3.76(3H, s), 3.71–3.62(2H, m), 3.66(3H, s), 3.61–3.45(2H, m), 3.45–3.08(1H, m), 2.81–2.64(2H, m), 2.39–2.29(1H, m), 2.14–2.04(2H, m), 2.05–1.90(1H, m), 1.90–1.68(1H, m), 1.62–1.39(7H, m), 1.35–1.26(6H, m), 1.26–1.13(6H, m), 0.91–0.77(6H, m), 0.75–0.52(4H, m).

MS(APCI、ESI) m/z : 1338($\text{M}+\text{H}$) $^+$

0911 実施例147：薬物リンカー45

()

[化251]

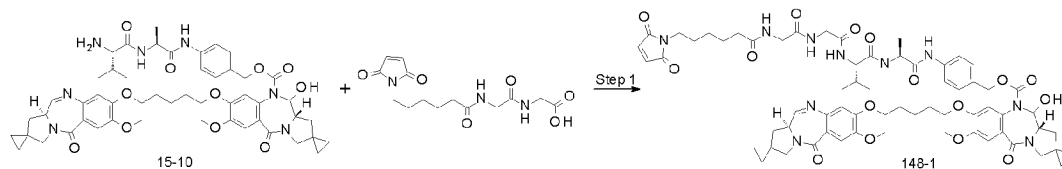


実施例3工程12で得られる化合物(0.050g, 0.049mmol)と市販の31-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-29-オキソ-4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25-オクタオキサ-28-アザヘントリアコンタン-1-オイックアシッド(0.029g, 0.049mmol)を実施例145と同様に反応させ、目的化合物  を得た



0912 実施 148 薬物リ カー

[化 252]

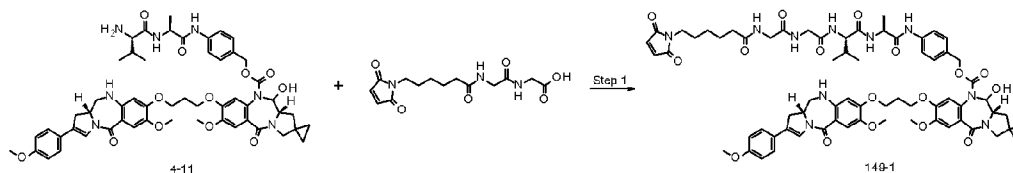


実施例 15 工程 9 にて得られた化合物 (0.081 g, 0.085 mmol) と市販の N-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシン (0.042 g, 0.13 mmol) を実施例 16 工程 1 と同様に反応させ、目的化合物 (0.089 g, 82%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1257 ($M+H$) +

[0913] 実施例 149 : 薬物リンカー 47

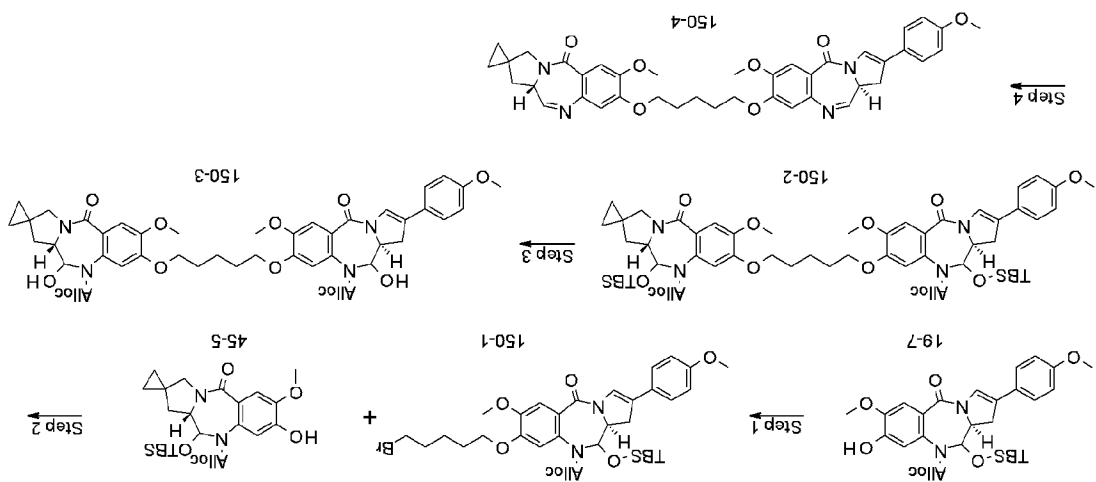
[化 253]



市販の N-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシン (0.036 g, 0.11 mmol) のジクロロメタン (10 ml) 溶液に、N-ε-(6-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridin-2-yl)hexanamide (0.035 g, 0.14 mmol) を室温にて加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液に、実施例 4 工程 11 にて得られた化合物 (0.10 g, 0.10 mmol) とメタノール (1 ml) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応溶液を濃縮後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム-クロロホルム : メタノール = 80 : 20 (v/v)) にて精製し、目的化合物 (0.078 g, 60%) を得た。

MS (APCI, ESI) m/z : 1309 ($M+H$) +

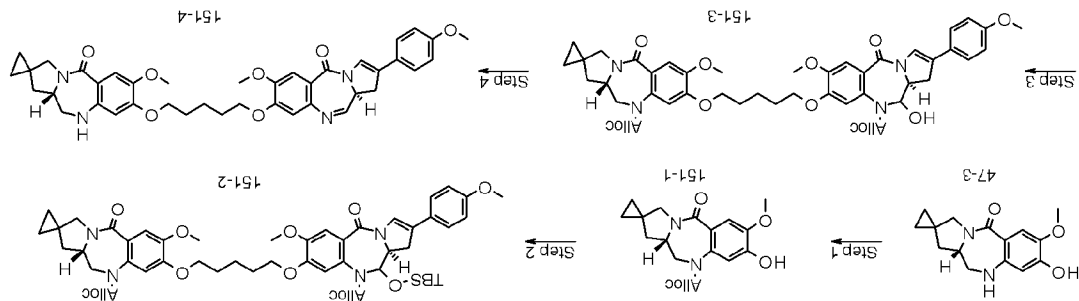
[0914] 実施例 150 : 薬物 11



実施例9工⁷で得⁴れ⁵た化合物を⁶実施例3工²、³、⁴、⁵、⁶、⁷、⁸、⁹、¹⁰、¹¹、¹²、¹³、¹⁴、¹⁵、¹⁶、¹⁷、¹⁸、¹⁹、²⁰、²¹、²²、²³、²⁴、²⁵、²⁶、²⁷、²⁸、²⁹、³⁰、³¹、³²、³³、³⁴、³⁵、³⁶、³⁷、³⁸、³⁹、⁴⁰、⁴¹、⁴²、⁴³、⁴⁴、⁴⁵、⁴⁶、⁴⁷、⁴⁸、⁴⁹、⁵⁰、⁵¹、⁵²、⁵³、⁵⁴、⁵⁵、⁵⁶、⁵⁷、⁵⁸、⁵⁹、⁶⁰、⁶¹、⁶²、⁶³、⁶⁴、⁶⁵、⁶⁶、⁶⁷、⁶⁸、⁶⁹、⁷⁰、⁷¹、⁷²、⁷³、⁷⁴、⁷⁵、⁷⁶、⁷⁷、⁷⁸、⁷⁹、⁸⁰、⁸¹、⁸²、⁸³、⁸⁴、⁸⁵、⁸⁶、⁸⁷、⁸⁸、⁸⁹、⁹⁰、⁹¹、⁹²、⁹³、⁹⁴、⁹⁵、⁹⁶、⁹⁷、⁹⁸、⁹⁹、¹⁰⁰、¹⁰¹、¹⁰²、¹⁰³、¹⁰⁴、¹⁰⁵、¹⁰⁶、¹⁰⁷、¹⁰⁸、¹⁰⁹、¹¹⁰、¹¹¹、¹¹²、¹¹³、¹¹⁴、¹¹⁵、¹¹⁶、¹¹⁷、¹¹⁸、¹¹⁹、¹²⁰、¹²¹、¹²²、¹²³、¹²⁴、¹²⁵、¹²⁶、¹²⁷、¹²⁸、¹²⁹、¹³⁰、¹³¹、¹³²、¹³³、¹³⁴、¹³⁵、¹³⁶、¹³⁷、¹³⁸、¹³⁹、¹⁴⁰、¹⁴¹、¹⁴²、¹⁴³、¹⁴⁴、¹⁴⁵、¹⁴⁶、¹⁴⁷、¹⁴⁸、¹⁴⁹、¹⁵⁰、¹⁵¹、¹⁵²、¹⁵³、¹⁵⁴、¹⁵⁵、¹⁵⁶、¹⁵⁷、¹⁵⁸、¹⁵⁹、¹⁶⁰、¹⁶¹、¹⁶²、¹⁶³、¹⁶⁴、¹⁶⁵、¹⁶⁶、¹⁶⁷、¹⁶⁸、¹⁶⁹、¹⁷⁰、¹⁷¹、¹⁷²、¹⁷³、¹⁷⁴、¹⁷⁵、¹⁷⁶、¹⁷⁷、¹⁷⁸、¹⁷⁹、¹⁸⁰、¹⁸¹、¹⁸²、¹⁸³、¹⁸⁴、¹⁸⁵、¹⁸⁶、¹⁸⁷、¹⁸⁸、¹⁸⁹、¹⁹⁰、¹⁹¹、¹⁹²、¹⁹³、¹⁹⁴、¹⁹⁵、¹⁹⁶、¹⁹⁷、¹⁹⁸、¹⁹⁹、²⁰⁰、²⁰¹、²⁰²、²⁰³、²⁰⁴、²⁰⁵、²⁰⁶、²⁰⁷、²⁰⁸、²⁰⁹、²¹⁰、²¹¹、²¹²、²¹³、²¹⁴、²¹⁵、²¹⁶、²¹⁷、²¹⁸、²¹⁹、²²⁰、²²¹、²²²、²²³、²²⁴、²²⁵、²²⁶、²²⁷、²²⁸、²²⁹、²³⁰、²³¹、²³²、²³³、²³⁴、²³⁵、²³⁶、²³⁷、²³⁸、²³⁹、²⁴⁰、²⁴¹、²⁴²、²⁴³、²⁴⁴、²⁴⁵、²⁴⁶、²⁴⁷、²⁴⁸、²⁴⁹、²⁵⁰、²⁵¹、²⁵²、²⁵³、²⁵⁴、²⁵⁵、²⁵⁶、²⁵⁷、²⁵⁸、²⁵⁹、²⁶⁰、²⁶¹、²⁶²、²⁶³、²⁶⁴、²⁶⁵、²⁶⁶、²⁶⁷、²⁶⁸、²⁶⁹、²⁷⁰、²⁷¹、²⁷²、²⁷³、²⁷⁴、²⁷⁵、²⁷⁶、²⁷⁷、²⁷⁸、²⁷⁹、²⁸⁰、²⁸¹、²⁸²、²⁸³、²⁸⁴、²⁸⁵、²⁸⁶、²⁸⁷、²⁸⁸、²⁸⁹、²⁹⁰、²⁹¹、²⁹²、²⁹³、²⁹⁴、²⁹⁵、²⁹⁶、²⁹⁷、²⁹⁸、²⁹⁹、³⁰⁰、³⁰¹、³⁰²、³⁰³、³⁰⁴、³⁰⁵、³⁰⁶、³⁰⁷、³⁰⁸、³⁰⁹、³¹⁰、³¹¹、³¹²、³¹³、³¹⁴、³¹⁵、³¹⁶、³¹⁷、³¹⁸、³¹⁹、³²⁰、³²¹、³²²、³²³、³²⁴、³²⁵、³²⁶、³²⁷、³²⁸、³²⁹、³³⁰、³³¹、³³²、³³³、³³⁴、³³⁵、³³⁶、³³⁷、³³⁸、³³⁹、³⁴⁰、³⁴¹、³⁴²、³⁴³、³⁴⁴、³⁴⁵、³⁴⁶、³⁴⁷、³⁴⁸、³⁴⁹、³⁵⁰、³⁵¹、³⁵²、³⁵³、³⁵⁴、³⁵⁵、³⁵⁶、³⁵⁷、³⁵⁸、³⁵⁹、³⁶⁰、³⁶¹、³⁶²、³⁶³、³⁶⁴、³⁶⁵、³⁶⁶、³⁶⁷、³⁶⁸、³⁶⁹、³⁷⁰、³⁷¹、³⁷²、³⁷³、³⁷⁴、³⁷⁵、³⁷⁶、³⁷⁷、³⁷⁸、³⁷⁹、³⁸⁰、³⁸¹、³⁸²、³⁸³、³⁸⁴、³⁸⁵、³⁸⁶、³⁸⁷、³⁸⁸、³⁸⁹、³⁹⁰、³⁹¹、³⁹²、³⁹³、³⁹⁴、³⁹⁵、³⁹⁶、³⁹⁷、³⁹⁸、³⁹⁹、⁴⁰⁰、⁴⁰¹、⁴⁰²、⁴⁰³、⁴⁰⁴、⁴⁰⁵、⁴⁰⁶、⁴⁰⁷、⁴⁰⁸、⁴⁰⁹、⁴¹⁰、⁴¹¹、⁴¹²、⁴¹³、⁴¹⁴、⁴¹⁵、⁴¹⁶、⁴¹⁷

[illegible]

美施例151：藥物12 [化255]

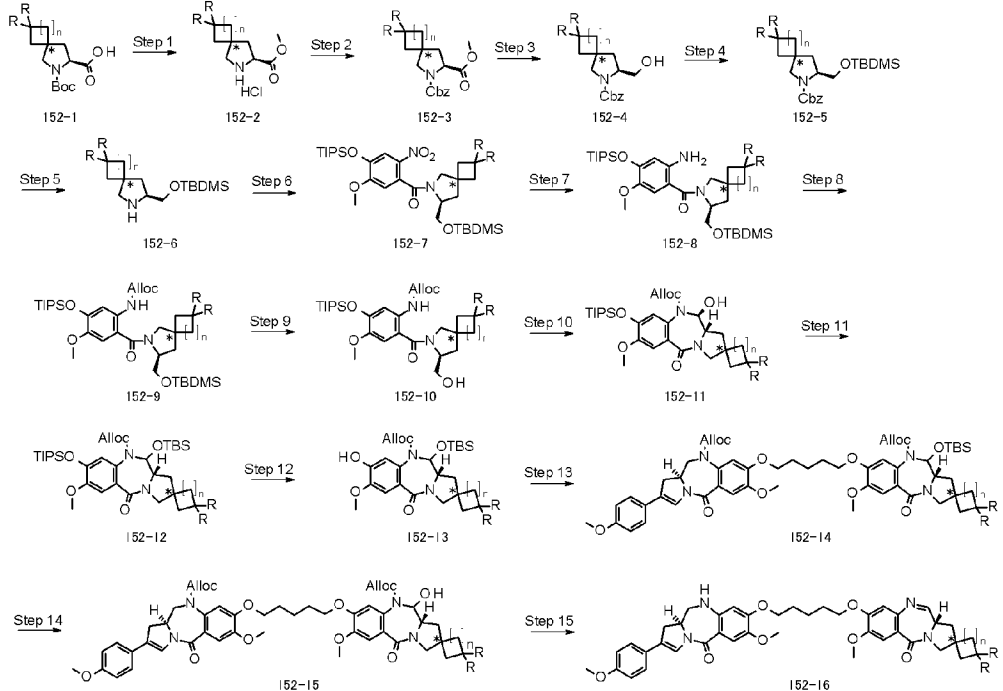


実施例47工程3で得られる化合物 (0. 77g, 2. 8mmol) をジクロロメタン (

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.89 (1H, d, J=4.2 Hz), 7.59 (1H, s), 7.53 (1H, s), 7.40 (1H, s), 7.3 (4H, d, J=8.5 Hz), 6.91 (2H, d, J=8.5 Hz), 6.82 (1H, s), 6.05 (1H, s), 4.44-4.39 (1H, m), 4.16-4.11 (2H, m), 4.09-4.04 (2H, m), 3.99 (2H, t, J=6.7 Hz), 3.95 (3H, s), 3.8 (4H, d, J=8.5 Hz), 2.7 (1H, dd, J=8.5 Hz, 2.4 Hz), 2.4 (2H, m), 2.2 (2H, m), 2.0 (2H, m), 1.7 (2H, t, J=6.7 Hz), 1.5 (2H, t, J=6.7 Hz), 1.4 (2H, t, J=6.7 Hz), 1.3 (2H, t, J=6.7 Hz), 1.2 (2H, t, J=6.7 Hz), 1.1 (2H, t, J=6.7 Hz), 1.0 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.9 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.8 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.7 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.6 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.5 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.4 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.3 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.2 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.1 (2H, t, J=6.7 Hz), 0.0 (2H, t, J=6.7 Hz).

[化 256]

n=0 R=F, * : (R) or (S)
n=1 R=F or H



[シクロプロチル誘導体 : 薬物 13] n = 1 , R = F

[工程 1]

市販の N-T-BOC-4_ (3, 3-ジフルオロシクロプロチル) -L-プロリン (オメガケム社 OC-0707) (12g, 41mmol) のメタノール (200mL) 溶液に、 -78°C (ドライアイス-アセトン浴) にて、塩化チオニル (10mL, 138mmol) をゆっくりと滴下した。滴下後、冷媒浴をはずし、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣をジエチルエーテルで洗浄し、目的化合物 (10g, quant.) を得た。

[工程 2]

上記工程 1 で得られた化合物 (10g, 41.4mmol) と炭酸ナトリウム (8.77g, 82.7mmol) との 1, 4-ジオキサン (200mL)、水 (50mL) 懸濁溶液に、氷冷下にて、クロロギ酸ベンジル (8.82mL, 62.0mmol) をゆっくりと滴下した。反応終了後、水を加え、反応混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減

下に を留去し 的化合 を

[工程3～15]

上記 程で得 る化合 を、 施例1工程1 5 か 例45 程1 と同

に反応させることにより薬物13を得た。

¹ HNMR (CDCl ₃)	2	(1H)	7.49 (	4-7	2
m)	1	(m), 4.1 (m), 4.15-4.04 (2 m), 4.2			
4(3H, s)	2	4(2H, s), 2			(2H)
44 (	(4	. 7 1 (4			
MS(APCI, ESI) ⁺ m/z: 743(M+H) ⁺					

[0917] [シクロブチル誘導体：薬物14] n=1, R=H

[工程2～15]

市販の4 シク ブチル リンメ 、 ステル塩酸塩 オ ガケム
社0C-0728) を、 上記工程2、 実施例1工程1～5、 実施例45工程1～8と同様に
反応させることにより薬物リンカー14を得た。

¹ HNMR (CDCl ₃)	. 73	4	, 7. 4-7 14 2	4	42
(1H)	5	(m), 4.49-4.2 (m), 4.7-			
77 2 (1H)	77 2	7-2.			
77 2 (1H)	77 2	7-2.			
MS(APCI, ESI) ⁺ m/z: 707(M+H) ⁺					

[シクロブチル誘導体：薬物15] n=0, R=F, *: (S)

市販の1-tert B C 4S 2, 2 ジブチルオロシクロブチ

ン (オメガケム社0C-0732) を、 上記工程1～15と同様に反応させることによ
り薬物リンカー15を得た。

¹ HNMR (CDCl ₃)	5	54-7 77 2	7. 2	2	
2	(1	m), 4.2 4. m), 4.			
4(3H, s)	1	74-3. (3H,			5 (2H)
22 2 .	2	(1			(4
11, 1,					

シロロピレ誘導体

市販のN-t-BOC-4R-(2, 2-ジフルオロシクロプロピル)-L-プロリン(オメガケム社OC-0722)を、上記工程1~15と同様に反応させることにより薬物リンカー16を得た。

δ

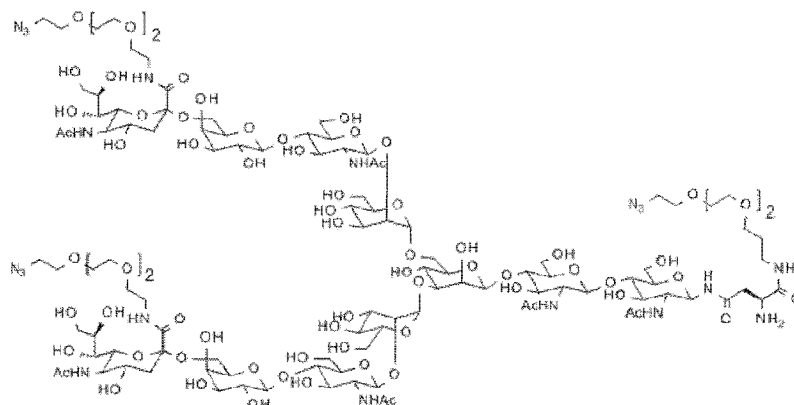
実施例1 [N

程 一体

Fmoc-(SG)-Asn (1S2S-11NC-Asn-Fmoc、糖鎖工学研究所製、2g)を適量の0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解させ、複数回に分けて逆相HPLC分離精製した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置にはPurify-Rp2(昭光サイエンティフィック製)を使用し、カラムにはInertsil ODS-3(GLサイエンス製)を使用した。溶出中にUV検出(220nm)された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥した。無色固体(1.8g)を得た。

工程2: ([N₃-PEG(3)]₂-SG)-Asn-PEG(3)-N₃の合成

[化257]



工程 1 で調製した Fmoc— (SG—) Asn フリー体 (1000mg) の N, N—ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) に対して、HATU (891 mg, 2.34 mmol) の N, N—ジメチルホルムアミド溶液 (3 mL)、11—アジド—3, 6, 9—トリオキサウンデカン—1—アミン (東京化成工業 (株), 511 mg, 2.34 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (816 μ L, 4.69 mmol) の N, N—ジメチルホルムアミド溶液 (3 mL) を加え、37℃で3時間攪拌した。更に、HATU (148 mg, 0.39 mmol) の N, N—ジメチルホルムアミド溶液 (500 μ L) を加え、37℃で1時間攪拌した。その後、ピペリジン (386 μ L, 3.91 mmol) を加え、37℃で1時間攪拌した。反応終了後、酢酸 (469 μ L) を加えた。

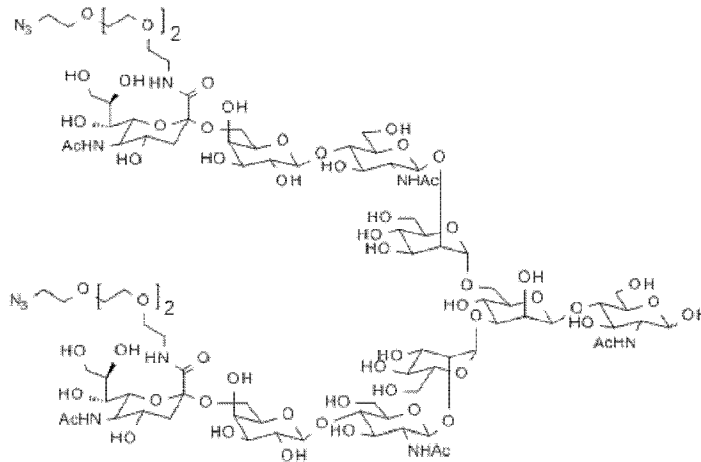
あらかじめジエチルエーテル (100 mL) を加えたジャンボコニカルチューブ (175 mL) 2本に反応液半分ずつ移した。小型遠心機 (日立エ機、CF16RX) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。ガム状の固形物を遠沈管 (50 mL) に移し、ジエチルエーテル (30 mL)、アセトニトリル (10 mL) を加え、デカンテーションした。この操作を2回繰り返した。同様にして、適量のアセトニトリル、あるいは適量のジエチルエーテルを加えて、デカンテーションした後に、減圧下乾燥し、粗生成物を得た。得られた固形物を適量の 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解させ、逆相 HPLC 分離精製した。0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置には Purif_Rp2 (昭光サイエンティフィック製) を使用し、カラムには Inerts は ODS—3 (GLサイエンス製) を使用した。溶出中に UV 検出 (220 nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、表記目的化合物 (637 mg) を無色固体として得た。

ESI-MS : Calcd for $C_{112}H_{192}N_{20}O_{70}$: $[M+3H]^{3+}$ 980.6 (ave.), Found 980

. 4

[0921] 工程 3 : $[N_3\text{-PEG (3)}]_2\text{-SG (10)}$ の合成

[化 258]



2 mL のチューブに、工程 2 で合成した ([N₃- PEG (3)]₂- SG) - Asn - PEG (3) - N₃ (78.6 mg) を 100 mM リン酸バッファー、pH 6.0 (ナカライテスク (株))、465 μl に溶解させた。1 U/mL EndoM (東京化成工業 (株))、70 μL) を加え、28℃ で 5 時間振とうした後、室温で 4 日間静置した。反応終了後、適量の 0.2% トリフルオロ酢酸水溶液を加え、逆相 HPLC 分離精製した。0.1% トリフルオロ酢酸水溶液と 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置には Purif_Rp2 (昭光サイエンティフィック製) を使用し、カラムには Inertsil ODS-3 (GL サイエンス製) を使用した。溶出中に UV 検出 (220 nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、表記目的化合物 (40 mg) を無色固体として得た。

ESI-MS : Calcd for C₉₂H₁₅₇N₁₃O₆₁ : [M+2H]²⁺ 1211.7 (ave.), Found 1211.5

[0922] 実施例 154 : [N₃- PEG (3)] - MSG2 (9) 、 [N₃- PEG (3)] - MSG1 (9)

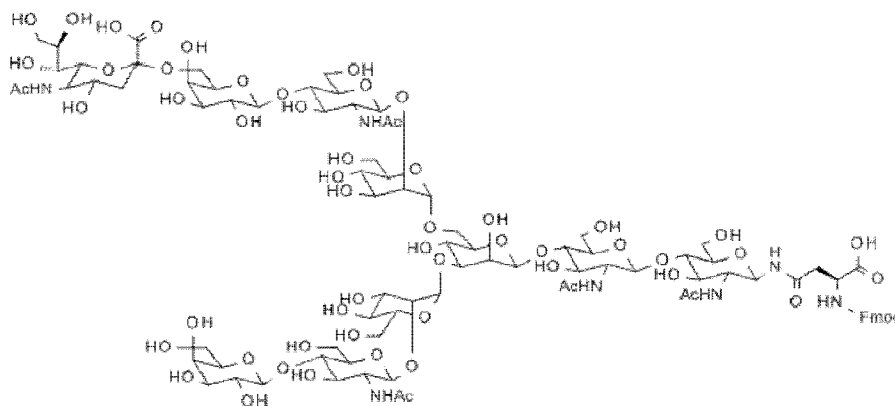
工程 1 : (MSG1-) Asn と (MSG2-) Asn

市販品である monosialo-Asn free (1S2G/1G2S-10NC-Asn、(株) 糖鎖工学研究所製) (「(MSG-) Asn」と呼ぶ) (500 mg) を以下の条件で逆相 HPLC 分離精製し、1st main peak として溶出される (MSG1-) Asn (保持時間 15 ~ 19 min 付近) と 2nd main peak として溶出される (MSG2-) A

sn (保持時間 21~26 min 付近) に分離した。0.1% ぎ酸水溶液を溶離液として使用し、装置にはELS—PDA トリガー分取システム (日本分光株式会社製) を使用し、カラムにはInertsil ODS—3 (10 μ m、3.0 ϕ $\times$ 250 mm、GLサイエンス社製) を使用し、流速を30mL/minとした。溶出中にUV検出 (210nm) された最初のピークに帰属するフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、(MSG1-) Asn (238mg) を無色固体として得た。UV検出される2つ目のピークに帰属するフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、(MSG2-) Asn (193mg) を無色固体として得た。

[0923] 工程—2 : Fmoc - (MSG2 -) Asn フリー体

[化 259]



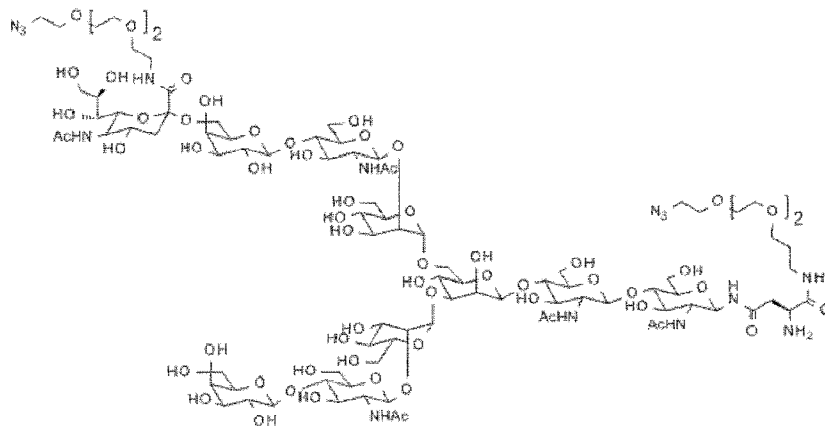
工程1で合成した (MSG2-) Asn (900mg) をN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (6mL) / 蒸留水 (2mL) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン (0.23 ml) と炭酸9-フルオレニルメチルN-スクシンイミジル (223mg) を加え、室温で30分攪拌した。さらに、ジイソプロピルエチルアミン (0.16 ml) と炭酸9-フルオレニルメチルN-スクシンイミジル (74mg) とN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (1mL) 加え、室温で30分攪拌した。

あらかじめジエチルエーテル (80mL) / アセトニトリル (4mL) を加えたジャンボコニカルチューブ (175mL) 2本に反応液半分ずつ移した。小型遠心機 (日立エ機、CF16RX) を利用して、固形物を沈殿させ、上澄みを取り除いた。ガム状の固形物を遠沈管 (50mL) に移し、ジエチルエーテル (80mL) 、アセトニトリル (10mL) を加え、デカンテーションした。この操作を2回繰り返した。

た。同様にして、適量のアセトニトリル、あるいは適量のジエチルエーテルを加えて、デカンテーションした後に、減圧下乾燥し、粗生成物を得た。得られた固形物を適量の0.2%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解させ、逆相HPLC分離精製した。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置にはPur if _ R_p2（昭光サイエンティフィック製）を使用し、カラムにはInerts i L ODS—3（GLサイエンス製）を使用した。溶出中にUV検出（220nm）された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、表記目的化合物（830mg）を無色固体として得た。

[0924] 工程3：（[N₃-PEG（3）]-MSG2）-Asn-PEG（3）-N₃

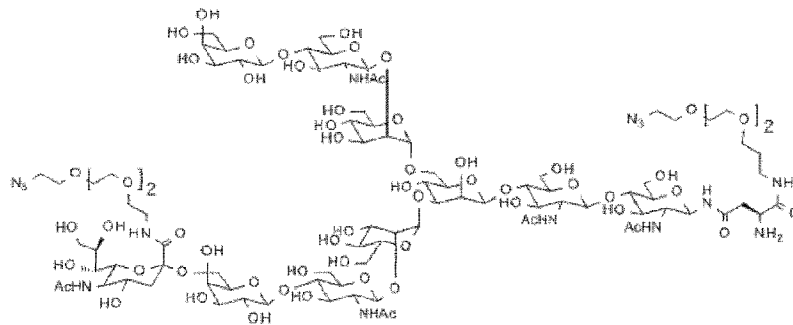
[化260]



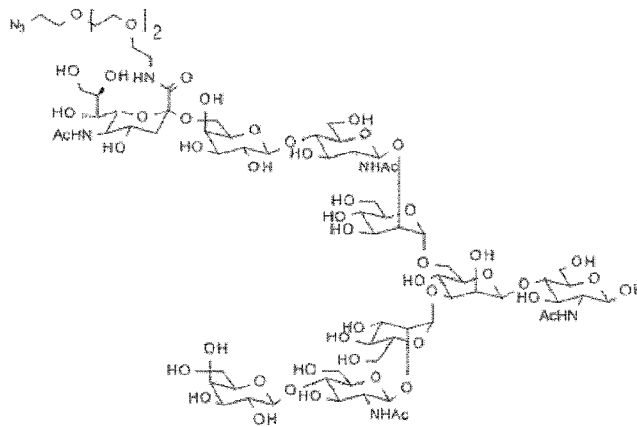
工程2で合成したFmoc—（MSG2—）Asn（830mg）を使い、実施例153の工程2と同様の方法で、表記目的物の粗生成物（1.06g）を固体として得た。これ以上精製せずに、次の反応に用いた。

[0925] 同様にして、Fmoc—（MSG1—）Asnから、下記（[N₃-PEG（3）]-MSG1）-Asn-PEG（3）-N₃の合成が可能である。

[化 261]

工程 4 : [N₃-PEG (3)] -MSG2 (9)

[化 262]

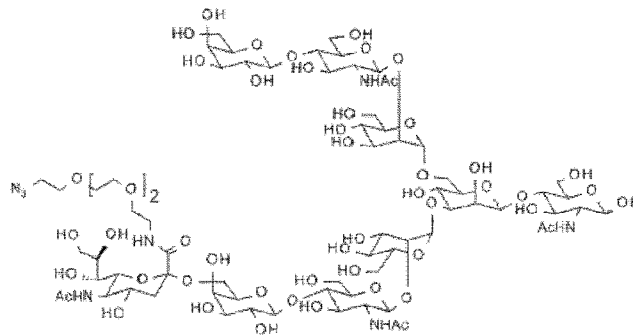


2mLのコレクションバイアルに、工程3で合成した ([N₃-PEG (3)] -MSG2) -Asn -PEG (3) -N₃粗生成物 (150mg) を、200mM KH₂PO₄と200mM KH₂PO₄で調製した200mM リン酸カリウムバッファー、pH6. 25 (750 μl) に溶解させた。Endo - Rp (3ug) 加え、50℃で16時間静置した。反応終了後、5% トリフルオロ酢酸水溶液 (150 μl) を加え、逆相 HPLC 分離精製した。0. 1% トリフルオロ酢酸水溶液と0. 1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とし、装置にはELS - PDA トリガー分取システム (日本分光株式会社製) を使用し、カラムにはInerts は ODS - 3 (GLサイエンス製) を使用した。溶出中にUV検出 (210nm) された目的物を含むフラクションを一つにまとめ、凍結乾燥して、表記目的化合物 (62mg) を無色固体として得た。

ESI-MS : Calcd for C₇₃H₁₂₄N₈O₅₁ : [M+2H]²⁺ 965. 3 (ave.), Found 965. 4

[0926] 同様にして ([N₃-PEG (3)] -MSG1) -Asn-PEG (3) -N₃から、下記 [N₃-PEG (3)] -MSG1 (9) の合成が可能である。

[化263]



産業上の利用可能性

[0927] 本発明の抗体-薬物コンジュゲート、抗体及び/又はPBD誘導体等を用いることにより、各種癌の治療又は予防が可能となる。

配列表 フリーテキスト

[0928] 配列番号1 : ヒトCLDN6のアミノ酸配列

配列番号2 : ヒトCLDN6のアミノ酸配列をコードするcDNAのヌクレオチド配列

配列番号3 : ヒトCLDN9のアミノ酸配列

配列番号4 : ヒトCLDN9のアミノ酸配列をコードするcDNAのヌクレオチド配列

配列番号5 : B1抗体軽鎖のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号6 : B1抗体軽鎖のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号7 : B1抗体軽鎖のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号8 : ヒト化B1抗体軽鎖L4のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号9 : B1抗体重鎖のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号10 : B1抗体重鎖のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号11 : B1抗体重鎖のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号12 : C7抗体軽鎖のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号13 : C7抗体軽鎖のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号14 : C7抗体軽鎖のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号15 : C7抗体重鎖のCDRH1のアミノ酸配列

- 配列番号 16 : C7抗体重鎖のCDRH2のアミノ酸配列
- 配列番号 17 : C7抗体重鎖のCDRH3のアミノ酸配列
- 配列番号 18 : B1抗体軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列
- 配列番号 19 : B1抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 20 : B1抗体重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列
- 配列番号 21 : B1抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 22 : C7抗体軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列
- 配列番号 23 : C7抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 24 : C7抗体重鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列
- 配列番号 25 : C7抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 26 : ヒト軽鎖シグナル配列及びヒトκ鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片
- 配列番号 27 : ヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1 LALA定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片
- 配列番号 28 : chB1軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 29 : chB1軽鎖のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むDNA断片
- 配列番号 30 : chB1軽鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 31 : chB1軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 32 : chB1重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号 33 : chB1重鎖をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 34 : chB1重鎖の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 35 : chB1重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 36 : ヒト化抗体軽鎖hL1のアミノ酸配列
- 配列番号 37 : ヒト化抗体軽鎖hL1をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 38 : ヒト化抗体軽鎖hL1の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号 39 : ヒト化抗体軽鎖hL1の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 40 : ヒト化抗体軽鎖hL2のアミノ酸配列
- 配列番号 41 : ヒト化抗体軽鎖hL2をコードするヌクレオチド配列

- 配列番号42 : ヒト化抗体軽鎖 hL2 の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号43 : ヒト化抗体軽鎖 hL2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号44 : ヒト化抗体軽鎖 hL3 のアミノ酸配列
- 配列番号45 : ヒト化抗体軽鎖 hL3 をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号46 : ヒト化抗体軽鎖 hL3 の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号47 : ヒト化抗体軽鎖 hL3 の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号48 : ヒト化抗体軽鎖 hL4 のアミノ酸配列
- 配列番号49 : ヒト化抗体軽鎖 hL4 をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号50 : ヒト化抗体軽鎖 hL4 の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号51 : ヒト化抗体軽鎖 hL4 の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号52 : ヒト化抗体重鎖 hH1 のアミノ酸配列
- 配列番号53 : ヒト化抗体重鎖 hH1 をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号54 : ヒト化抗体重鎖 hH1 の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号55 : ヒト化抗体重鎖 hH1 の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号56 : ヒト化抗体重鎖 hH2 のアミノ酸配列
- 配列番号57 : ヒト化抗体重鎖 hH2 をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号58 : ヒト化抗体重鎖 hH2 の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号59 : ヒト化抗体重鎖 hH2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号60 : ヒト化抗体重鎖 hH3 のアミノ酸配列
- 配列番号61 : ヒト化抗体重鎖 hH3 をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号62 : ヒト化抗体重鎖 hH3 の可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号63 : ヒト化抗体重鎖 hH3 の可変領域をコードするヌクレオチド配列
- 配列番号64 : Trastuzumab 軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号65 : Trastuzumab 重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号66 : 抗 LPS 抗体 (h#1G5-H 1L1) 軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号67 : 抗 LPS 抗体 (h#1G5-H 1L1) 重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号68 : 抗 TR0P2 抗体 (hRS7) 軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号69 : 抗 TR0P2 抗体 (hRS7) 重鎖のアミノ酸配列

配列番号70 :抗CD98抗体 (hM23-H 1L1) 軽鎖のアミノ酸配列

配列番号71 :抗CD98抗体 (hM23-H 1L1) 重鎖のアミノ酸配列

配列番号72 :Trastuzumab 変異体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号73 :Trastuzumab 変異体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号74 :Trastuzumab 変異体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号75 :Trastuzumab 変異体重鎖のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項 1] 次式：

[化 1]

(式中、 m^1 は1から10の整数を示し、

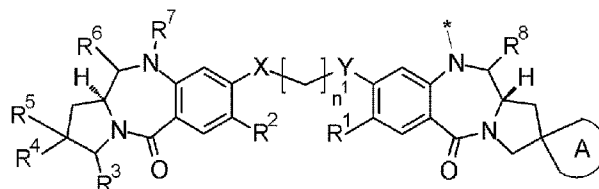
Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、該抗体の糖鎖はリモデリングされていてもよく、

Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、

Abはそのアミノ酸残基から直接Lに結合するか、Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からしに結合していてもよく、

Dは、次式で示される薬物を示し、

[化 2]



式中、アステリスクはLと結合していることを示し、

 n^1 は、2から8の整数を示し、

Aは、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環又は3～5員の飽和複素環を示し、

R¹及びR²は、それぞれ独立して、C₁～C₆アルコキシ基、C₁～C₆アルキル基、水素原子、水酸基、チオール基、C₁～C₆アルキルチオ基、ハロゲン原子又は-NR'¹R'²を示し、ここで、R'¹及びR'²は、それぞれ独立して、水素原子又はC₁～C₆アルキル基を示し、R³、R⁴及びR⁵は、下記 (i) ～ (iii) から選択され、(i) R³及びR⁴が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子と

もに二重結合を形成し、

R^5 は、群1から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群2から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基を示す、

(ii) おは、水素原子を示し、

R^4 及び R^5 が、 R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、3〜5員の飽和炭化水素環もしくは3〜5員の飽和複素環又は $CH_2=$ を形成する、

(iii) R^3 、 R^4 及び R^5 が、 R^3 が結合している炭素原子並びに R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、群3から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環を形成する、

R^6 及び R^7 は、共に水素原子を示すか、 R^6 及び R^7 と一緒にあって、イミン結合 ($C=N$) であることを示し、

R^8 は、水酸基又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基であり、

X及びYは、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子又は硫黄原子であり、

群1は、a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルコキシ基、

b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-C(=NR')$ 、 $-N(R')R''$ 及び $-N(R')R''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基、

c) ハロゲン原子、

d) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、

e) C_1 〜 C_6 アルキルチオ基、

f) $-NR'R''$ 、

g) $-C(=NR',)-NR''R'''$ 、

h) $-NHC(=NR',)-NR''R'''$ 、

i) $-NHCOR'$ 、又は

j) 水酸基を示し、

ここで、 R' 及び R'' は、前で定義した通りであり、 R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は $C_1\sim C_6$ アルキル基を示し、

群2は、ハロゲン原子、水酸基、又は $C_1\sim C_6$ アルコキシ基を示し、並びに、

群3は、ハロゲン原子、又は1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキル基もしくは $C_1\sim C_6$ アルコキシ基を示す)で示される抗体—薬物コンジュゲート。

[請求項2]

Aが、1～2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環を示し、

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、 $C_1\sim C_3$ アルコキシ基を示し、

R^3 及び R^4 が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに二重結合を形成し、

R^5 が、群4から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群5から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい $C_1\sim C_3$ アルキル基であることを示し、

X及びYが酸素原子であり、

群4は、a) 1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよい $C_1\sim C_3$ アルコキシ基、

b) 1～3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'''$ 、 $-C(=NR')-NR''R'''$ 、 $-NR''R'''$ 、及び $-NHC(=NR',)-NR''R'''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい $C_1\sim C_3$ アルキル基、

c) $C_3\sim C_5$ シクロアルコキシ基、

d) $-C(=NR',)-NR''R'''$ 、

e) $-NHC(=NR')-NR''R'''$ 、又は

f) 水酸基を示し、

ここで、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又はC1〜C3アルキル基を示し、並びに、

群5は、ハロゲン原子、水酸基、又はC1〜C3アルコキシ基を示す、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項3]

Aが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、C1〜C3アルコキシ基を示し、

おが、水素原子を示し、

R^4 及び R^5 が、 R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、3〜5員の飽和炭化水素環又は $=CH_2$ を形成し、並びに、

X及びYが酸素原子である、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項4]

Aが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、C1〜C3アルコキシ基を示し、

R^3 、 R^4 及び R^5 が、 R^3 が結合している炭素原子並びに R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒にあって、群6から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環を形成し、

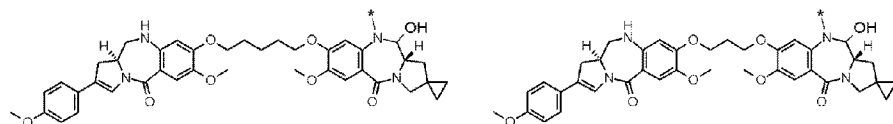
X及びYが酸素原子であり、並びに、

群6は、ハロゲン原子、又は1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1〜C3アルキル基もしくはC1〜C3アルコキシ基を示す、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項5]

Dが、以下の2式のいずれかで示され、

[化3]



式中、アステリスクはLと結合していることを示す、請求項1又は2に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項6] Dが、以下の2式のいずれかで示され、

[化4]



式中、アステリスクはLと結合していることを示す、請求項1又は3に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項7] Lが、 $\text{—Lb—La—Lp—NH—B—CH}_2\text{—O—C(=O)—}$ * で示され、

式中、アステリスクは、Dと結合していることを示し、

Bは、フェニル基又はヘテロアリール基を示し、

Lpは、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示し、

Laは、以下の群：

- C(=O) - (CH₂CH₂)_{n2} - C(=O) - 、
- C(=O) - (CH₂CH₂)_{n2} - C(=O) - NH - (CH₂CH₂)_{n3} - C(=O) - 、
- C(=O) - (CH₂CH₂)_{n2} - C(=O) - NH - (CH₂CH₂O)_{n3} - CH₂ - C(=O) - 、
- C(=O) - (CH₂CH₂)_{n2} - NH - C(=O) - (CH₂CH₂O)_{n3} - CH₂CH₂ - C(=O) - 、及び、
- (CH₂)_{n4} - O - C(=O) - 、

から選択されるいずれか一つを示し、

n²は1〜3の整数、n³は1〜5の整数、n⁴は0〜2の整数を示し、

Lbは、LaとAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサーを示す、請求項1〜6のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項8] Bが、1, 4-フェニル基、2, 5-ピリジル基、3, 6-ピリジル基、2, 5-ピリミジル基、2, 5-チエニル基から選択されるいずれか一つである、請求項7に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項 9] Bが、1,4-フェニル基である、請求項8に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項 10] Lpが、2から7個のアミノ酸で構成されるアミノ酸残基である、請求項7〜9のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項 11] Lpが、グリシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、イソロイシン、プロリン、シトルリン、ロイシン、セリン、リシン及びアスパラギン酸から選択されるアミノ酸からなるアミノ酸残基である、請求項7〜10のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

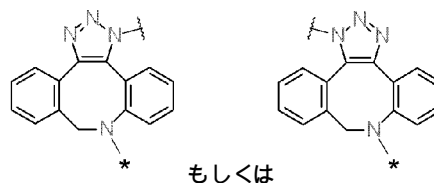
[請求項 12] Lpが、以下の群：
 -GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D-)PI-、及び、-GGPL-から選択される、請求項7〜11のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項 13] Laが、以下の群：
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、及び、-OC(=O)-

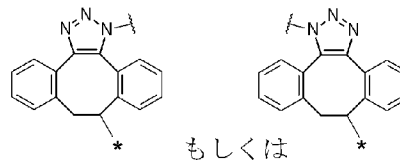
から選択される、請求項7〜12のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項 14] Lbが、次式で示され、

[化5]

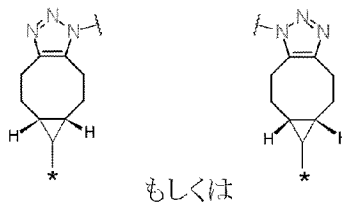


[化6]



、又は、

[化7]



上記で示されるLbの構造式において、アステリスクはLaと結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、請求項7～13のいずれか一つに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

[請求項 15]

Lが、 $\text{—Lb—La—Lp—NH—B—CH}_2\text{—O—C(=O)—}$ * で示され、

式中、Bは、1,4-フェニル基であり、

Lpは、以下の群：

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、及び、-GGPL-、

から選択されるいずれか一つを示し、

Laは、以下の群：

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-、

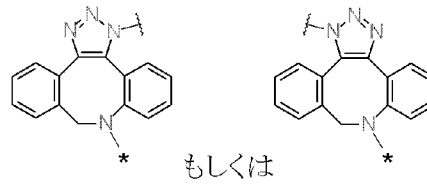
-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、及び、

-OC(=O)-、

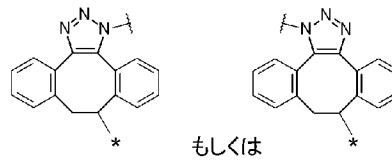
から選択されるいずれか一つを示し、並びに、

Lbは、次式で示され、

[化8]

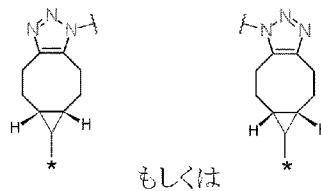


[化9]



、又は、

[化10]



ここで、上記で示されるLbの構造式において、アステリスクはLaと結合していることを示し、波線はAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、請求項7～14のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[請求項16]

Lが、以下の群：

- Z₁-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、
- Z₁-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GG-(D)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、
- Z₁-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、
- Z₁-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B-CH₂-OC(=O)-、
- Z₁-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGPI-NH-B-CH₂-OC(=O)-、
- Z₁-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-B-CH₂-OC(=O)-、
- Z₁-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH₂-OC(=O)-、

-Zi-C (=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGVK-NH-B-CH₂-OC (=O) -、

-Zi-C (=O) -CH₂CH₂- C(=O) -GGPL-NH-B-CH₂-OC (=O) -、

-Z'-C (=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂)₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC (=O) -、

-Z'-C (=O) -CH₂CH₂- C(=O) -NH- (CH₂CH₂O)₂-CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC (=O)

、

-Z'-C (=O) -CH₂CH₂-NH-C (=O) - (CH₂CH₂O)₄-CH₂CH₂- C(=O) -VA-NH-B-CH₂-OC (=

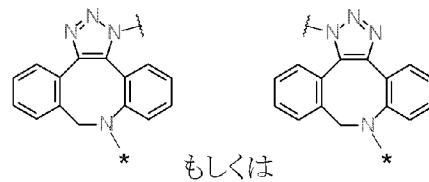
OK

-Z²-OC (=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC (=O) -、及び

-Z³-CH₂-OC (=O) -GGVA-NH-B-CH₂-OC (=O) -から選択され、

ここで、Ziは、以下の構造式：

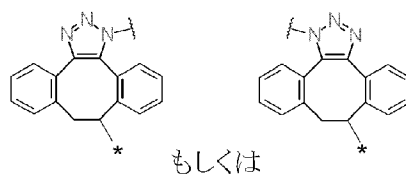
[化 11]



を示し、

Z²は、以下の構造式：

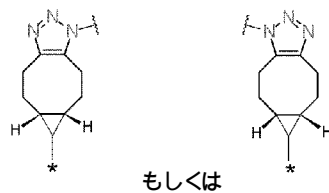
[化 12]



を示し、

Z³は、以下の構造式：

[化 13]



を示し、

ここで、 Z_1 、 Z^2 及び Z^3 の構造式において、アステリスクは La と結合していることを示し、波線は Ab の糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示し、並びに、

B は、1,4-フェニル基を示す、請求項7〜15のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[請求項 17]

L が、以下の群：

- $V-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$ 、

- $V-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$ 、

- $V-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$ 、

- $V-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$ 、 $-V-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$ 、

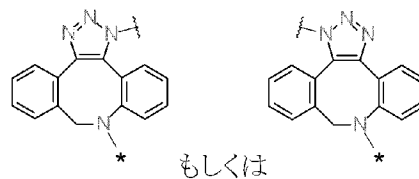
- $V-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$

-、及び

- $V-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-O-C(=O)-$ から選択され、

ここで、 B は1,4-フェニル基であり、 Z^1 は以下の構造式：

[化 14]



を示し、

ここで、 Z^1 の構造式において、アステリスクは Z^1 に隣接する $c(=o)$ と結合していることを示し、波線は Ab の糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す、請求項16に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[請求項 18]

L が、 $-Lb-La-L_p-NH-B-CH_2-O-C(=O)-*$ で示され、

式中、アステリスクは、 D と結合していることを示し、

Bは、1, 4-フェニル基を示し、

Lpは、-GGVA-、又は、-VAを示し、

Laは、 $-(CH_2)_{n^9}-C(=O)-$ 、又は、 $-(CH_2CH_2)_{n^{10}}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_{n^{11}}-CH_2CH_2-C(=O)-$ を示し、

n^9 は2〜7の整数、 n^{10} は1〜3の整数、 n^{11} は6〜10の整数を示し、

Lbは、-(Succinimid-3-yl)-である、請求項1〜6のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンjugate。

[請求項 19] Lが、以下の群：

- (Succinimid-3-yl)- $(CH_2)_5-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、

- (Succinimid-3-yl)- $(CH_2)_5-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、及び、

- (Succinimid-3-yl)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

から選択されるいずれか一つであることを示し、

ここで、Bは1, 4-フェニル基である、請求項18に記載の抗体-薬物コンjugate。

[請求項 20] 抗体が、IgGである、請求項1〜19のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンjugate。

[請求項 21] 抗体が、IgG1、IgG2又はIgG4である、請求項20に記載の抗体-薬物コンjugate。

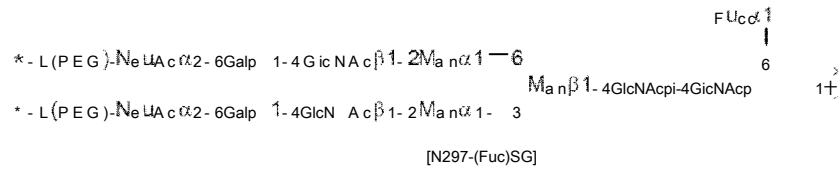
[請求項 22] 抗体が、腫瘍細胞に結合し、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化することを特徴とする、請求項1〜21のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンjugate。

[請求項 23] 抗体が、更に抗腫瘍効果を有することを特徴とする、請求項22に記載の抗体-薬物コンjugate。

[請求項 24] 抗体が、抗体のAsn297に結合する糖鎖（N297糖鎖）からLに結合している、請求項1〜17及び20〜23のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンjugate。

[請求項 25] N297糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、請求項24に記載の抗

[化 17]



式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

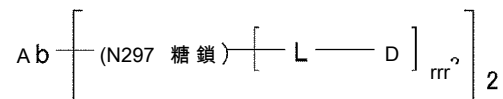
L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_{n^5}\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$ を示し、ここで、右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカーLと結合していることを示し、及び n^5 は2～10の整数を示す。

[請求項 27] n^5 が2～5の整数である、請求項 26に記載の抗体－薬物コンジュゲーション

[請求項 28] 次式：

[化 18]



(式中、 m^2 は1又は2の整数を示し、

Lは、AbのN297糖鎖とDを連結するリンカーであって、以下の群：

$-\text{Z}'\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGVA-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$ 、

$-\text{Z}''\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$ 、

$-\text{Z}'\text{-C(=O)-}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{-C(=O)-VA-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$ 、

$-\text{Z}'\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$ 、

$-\text{Z}'\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{-C(=O)-VA-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$ 、

$-\text{Z}'\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$

、及び

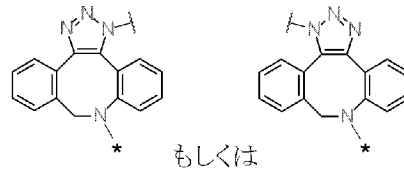
$-\text{Z}'\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-C(=O)-}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-B-CH}_2\text{-OC(=O)-}$

0)-

から選択されるいずれか一つのリンカーであり、

ここで、Bは1,4-フエニル基であり、Ziは以下の構造式：

[化19]



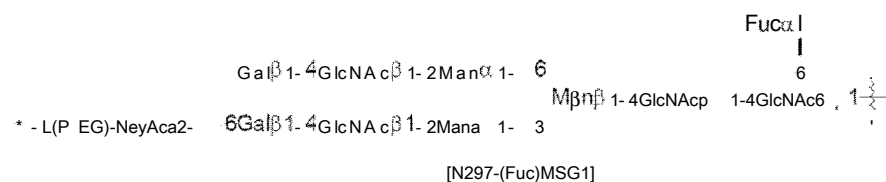
を示し、

ここで、上記で示されるZiの構造式において、アステリスクはZiに隣接するC(=O)と結合していることを示し、波線はAbのN297糖鎖と結合していることを示し、

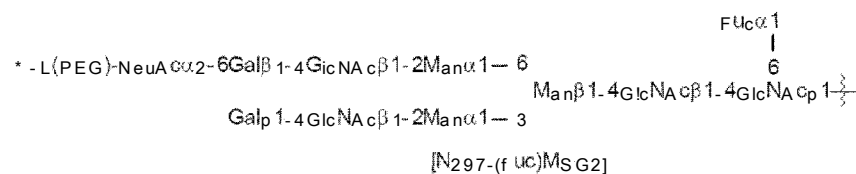
Abは、IgG抗体又は該抗体の機能性断片を示し、

AbのN297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであることを示し、

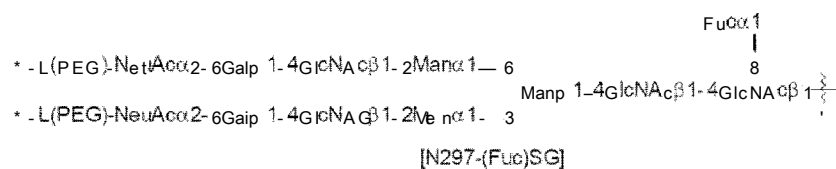
[化20]



[化21]



[化22]



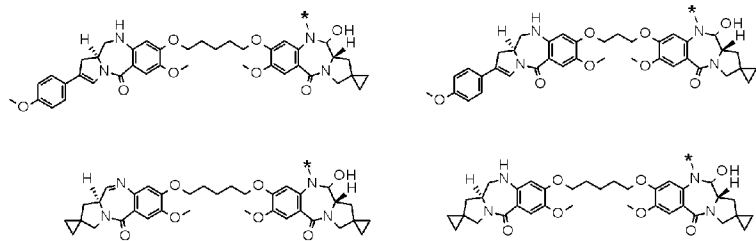
上記式中、波線は抗体のAsn297 に結合していることを示し、

N297糖鎖中のL(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_n^{\text{5-}}^*$ を示し、

ここで、 n^5 は2～5の整数であることを示し、左端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側又は/及び1-6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミト結合していることを示し、アステリスクは、前記リンカーLにおけるZiのトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示し、

Dは、以下の群から選択されるいずれか一つであり、

[化 23]



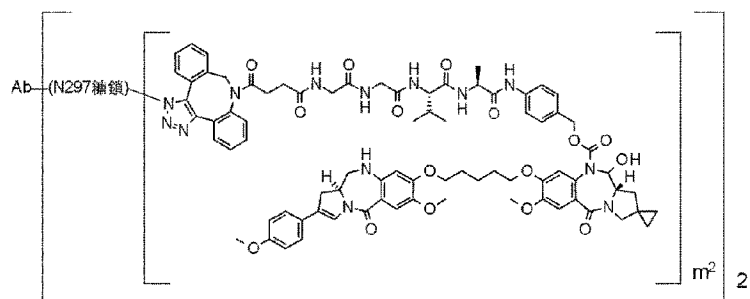
ここで、式中、アステリスクはLと結合していることを示す)

で示される請求項24～27のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュ
ゲート。

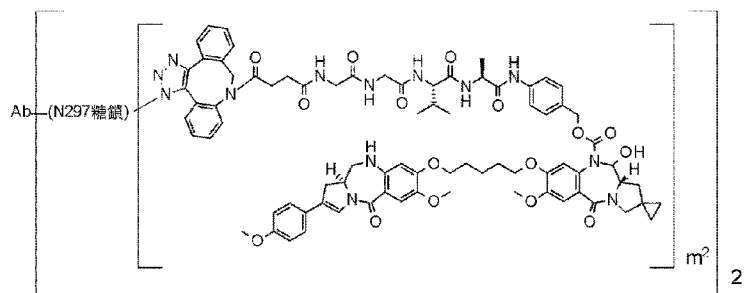
[請求項29]

次の群：

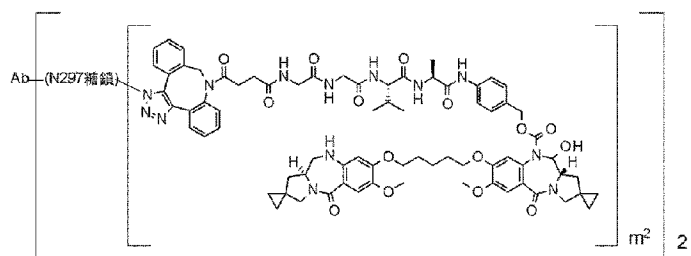
[化24]



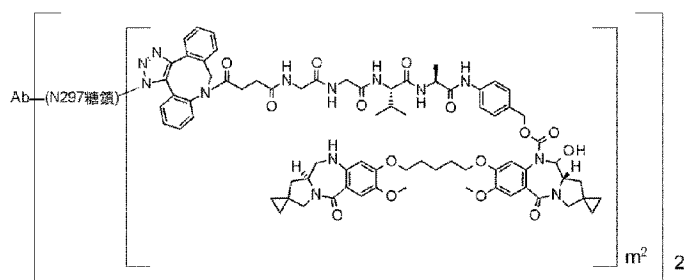
もしくは



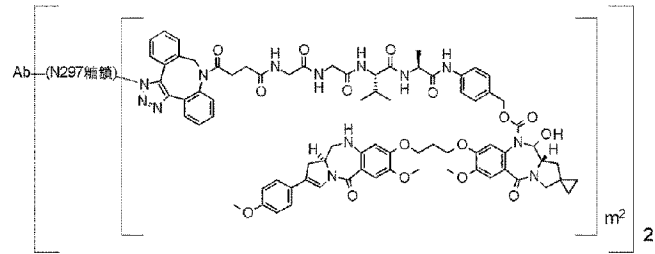
[化25]



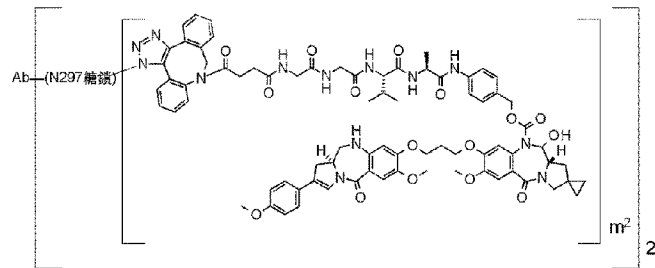
もしくは



[化26]

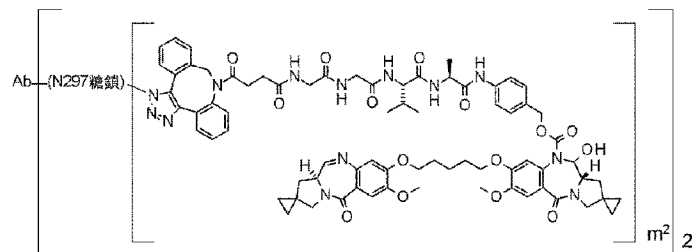


もしくは

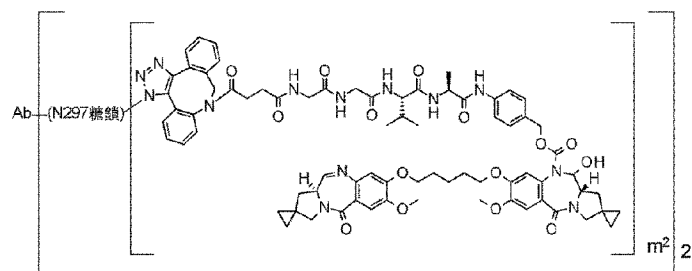


又は

[化27]



もしくは



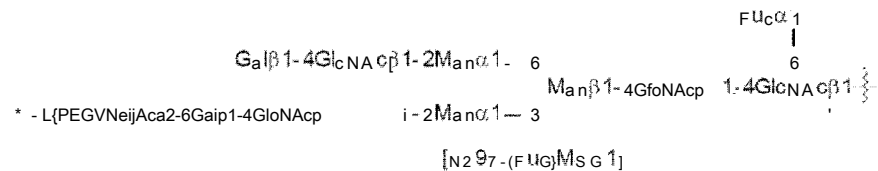
から選ばれ、

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

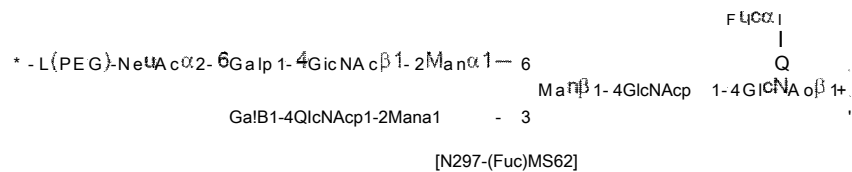
AbはIgG抗体又はその機能性断片であることを示し、

Ab の N297 糖鎖は次式で示される構造を有する N297- (Fuc) MSG1、N297- (Fuc) MSG2 もしくはそれらの混合物、又は N297- (Fuc) SG のいずれか一つであることを示し、

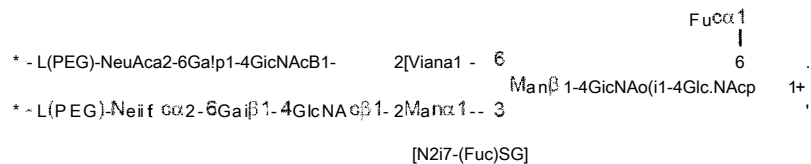
[化 28]



[化 29]



[化 30]



式中、波線は抗体のAsn297 に結合していることを示し、

N297 糖鎖中の L (PEG) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3^*$ であることを示し

—

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

[請求項30] CLDN6 及び/又はCLDN9 に結合する抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項31] CLDN6 が配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる分子であり、CLDN9が配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる分子である、請求項30に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項32] 以下の (a) 又は (b) に記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む重鎖、並びにCDRL1、CDRL2及びCDRL3を含む軽鎖を含んでなる、請求項30又は31に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、並びに、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1又は2個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるCDRL3、

(b) 配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号16に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、並びに、配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3。

[請求項33] 以下の (a) 又は (b) に記載のCDRH1、CDRH2及びCDRH3を含む重鎖、並びにCDRL1、CDRL2及びCDRL3を含む軽鎖を含んでなる、請求項32に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号9に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号11に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号7に記載のアミノ酸配列又は配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3、

(b) 配列番号15に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号16に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2及び配列番号17に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、及び配列番号12に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号13に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2及び配列番号14に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3。

[請求項 34] 以下の (a) 又は (b) に記載の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 30～33 のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号 21 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 19 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 25 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号 23 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[請求項 35] 以下の (a) ～ (e) からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び (f) ～ (k) からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 30～34 のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号 54 に記載のアミノ酸配列、

(b) 配列番号 58 に記載のアミノ酸配列、

(c) 配列番号 62 に記載のアミノ酸配列、

(d) (a) ～ (c) の配列において各 CDR 配列以外のフレームワーク領域の配列に対して少なくとも 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、

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

(f) 配列番号 38 に記載のアミノ酸配列、

(g) 配列番号 42 に記載のアミノ酸配列、

(h) 配列番号 46 に記載のアミノ酸配列、

(i) 配列番号 50 に記載のアミノ酸配列、

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

(k) (f) ～ (i) の配列における各 CDR 配列以外のフレームワーク領域

域の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列。

[請求項 36] 以下の (a) ～ (e) からなる群から選択される重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 35 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号 54 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 38 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(b) 配列番号 58 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 42 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(c) 配列番号 54 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 46 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、

(d) 配列番号 58 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 50 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなる軽鎖可変領域、及び、

(e) 配列番号 62 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および配列番号 46 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域。

[請求項 37] 抗体がキメラ抗体である、請求項 30～36 のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項 38] 抗体がヒト化抗体である、請求項 30～36 のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項 39] 抗体が、ヒトIgG1、ヒトIgG2 又はヒトIgG4 の重鎖定常領域を含む、請求項 30～38 のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項 40] 以下の (a) ～ (e) からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を含む、請求項 38 又は 39 に記載の抗体又は該抗体の機能性断片：

(a) 配列番号 52 のアミノ酸番号 20～471 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号 36 のアミノ酸番号 21～234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖 (H1 L1)、

(b) 配列番号 56 のアミノ酸番号 20～471 に記載のアミノ酸配列からなる、重鎖および配列番号 40 のアミノ酸番号 21～234 に記載のアミノ酸

配列からなる軽鎖 (H2L2) 、

(c) 配列番号52のアミノ酸番号20〜471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号44のアミノ酸番号21〜234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖 (H1 L3) 、

(d) 配列番号56のアミノ酸番号20〜471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号48のアミノ酸番号21〜234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖 (H2L4) 、及び、

(e) 配列番号60のアミノ酸番号20〜471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖および配列番号44のアミノ酸番号21〜234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖 (H3L3) 。

[請求項41] 請求項32〜36及び40のいずれか一つに記載の抗体が認識する抗原上の部位に結合する、請求項30又は31に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項42] 請求項32〜36及び40のいずれか一つに記載の抗体と、CLDN6及び/又はCLDN9への結合において競合する、請求項30又は31に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項43] 請求項30〜42のいずれか1項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[請求項44] 以下の (a) 〜 (j) からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む、請求項43に記載のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号54に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号38に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号58に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号42に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号54に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号46に記載のアミノ酸配列から

なる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号58に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号50に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号62に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号52のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号36のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号56のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号40のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、

(h) 配列番号52のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号44のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、

(i) 配列番号56のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号48のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド、及び、

(j) 配列番号60のアミノ酸番号20～471に記載のアミノ酸配列からなる重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号44のアミノ酸番号21～234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖をコードするポリヌクレオチド。

[請求項45]

請求項43又は44のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有す

る発現ベクター。

[請求項46]

請求項45に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[請求項47]

宿主細胞が真核細胞である請求項46に記載の宿主細胞。

[請求項48]

宿主細胞が動物細胞である請求項47に記載の宿主細胞。

[請求項49]

請求項46～48のいずれか一つに記載の宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含むことを特徴とする、請求項30～42に記載の抗体又は該抗体の機能性断片の製造方法。

[請求項50]

請求項49に記載の製造方法により得られることを特徴とする抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項51]

N-結合型糖鎖付加、O-結合型糖鎖付加、N末のプロセッシング、C末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末におけるメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、及び重鎖のカルボキシル末端における1つ又は2つのアミノ酸残基の欠失からなる群より選択される1又は2以上の修飾を含む、請求項30～42及び50のいずれか1項に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項52]

重鎖のカルボキシル末端において1つ又は数個のアミノ酸残基が欠失している、請求項51に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項53]

2本の重鎖の双方でカルボキシル末端において1つのアミノ酸残基が欠失している、請求項52に記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項54]

重鎖のカルボキシル末端のプロリン残基が更にアミド化されている、請求項50～53のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片。

[請求項55]

以下の工程：

1) 請求項46～48のいずれか一つに記載の宿主細胞を培養し、得られた培養物から目的の抗体を採取する工程、

ii) 工程i) で得られた抗体を加水分解酵素で処理し、 (Fuc α 1, 6

) G LcNAc —抗体を製造する工程、及び、

に₄) - 1 MSG (9) 又は SG (10) のシアル酸の2位のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有するPEGリンカーを導入し、還元末端をオキサゾリン化して得た糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で (Fuc α 1, 6) G LcNAc —抗体を反応させる工程、又は、

に₄) - 2 α —アミノ基が保護されていてもよい (MSG-) Asn 又は (SG-) Asn におけるシアル酸の2位のカルボン酸のカルボニル基及び前記 Asn のカルボン酸のカルボニル基にアジド基を有するPEGリンカーを導入し、加水分解酵素を作用させた後、還元末端をオキサゾリン化して得た糖鎖ドナー分子と、糖転移酵素存在下で (Fuc α 1, 6) G LcNAc - 抗体を反応させる工程、を含む糖鎖リモデリング抗体の製造方法。

[請求項 56] 更に、工程 に₄) の反応液を、ハイドロキシアパタイトカラムによる精製により (Fuc α 1, 6) G LcNAc —抗体を精製する工程を含む、請求項 55 に記載の製造方法。

[請求項 57] 以下の工程：

i) 請求項 55 又は 56 に記載の方法により、糖鎖リモデリング抗体を製造する工程、及び

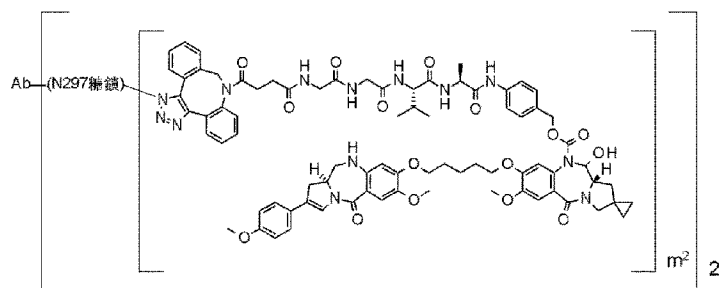
ii) DBCO を有するドラッグリンカーを工程 i) で作製された糖鎖リモデリング抗体の糖鎖におけるアジド基と反応させる工程を含む、請求項 1〜29 のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンjugate の製造方法。

[請求項 58] 請求項 55 又は 56 に記載の製造方法で得られることを特徴とする、糖鎖リモデリング抗体。

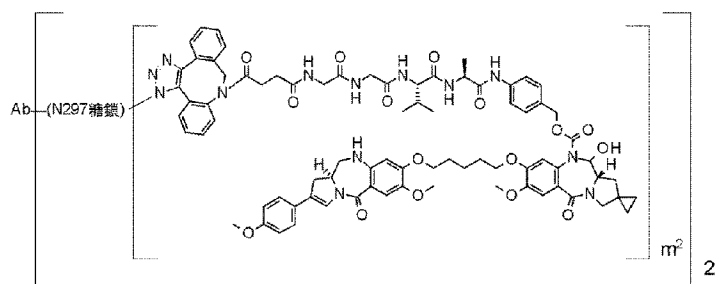
[請求項 59] 請求項 57 に記載の製造方法で得られることを特徴とする、抗体—薬物コンjugate。

[請求項 60] 次の群：

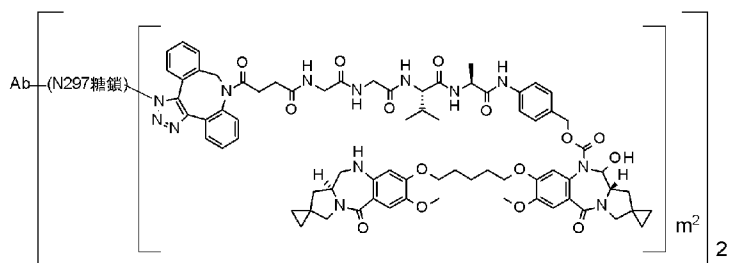
[化 3 1]



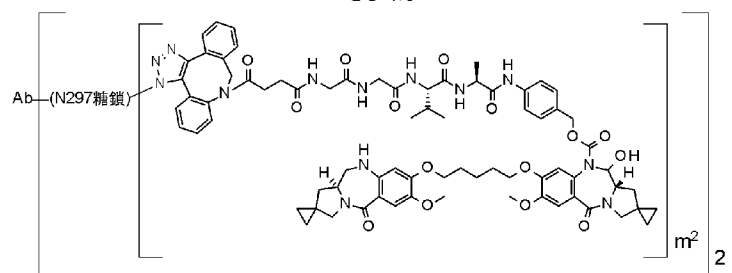
もしくは



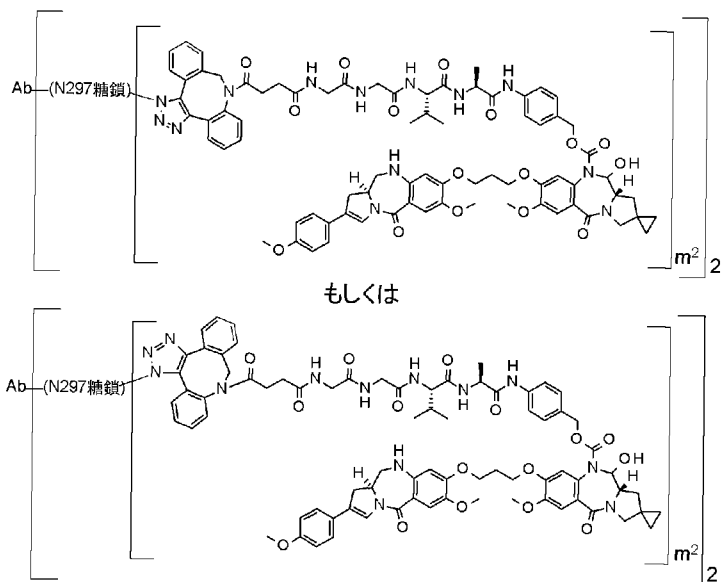
[化 32]



もしくは

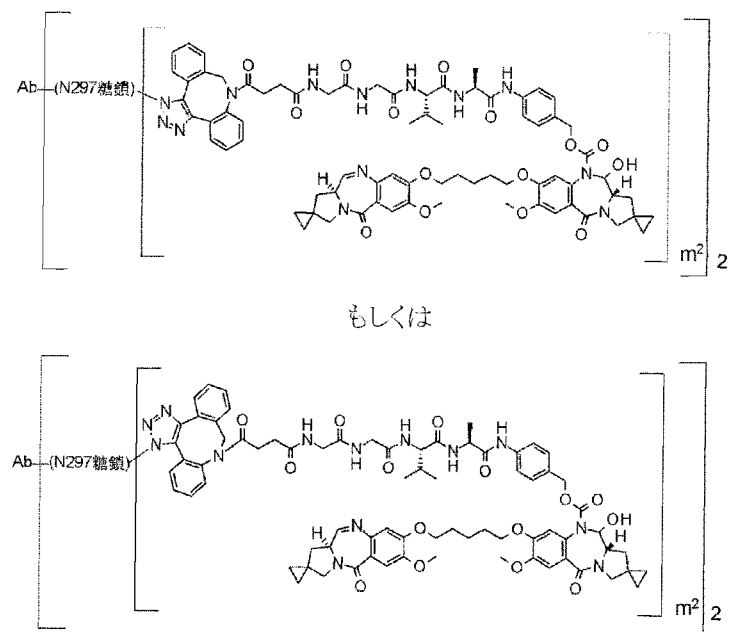


[化 33]



、又は、

[化 34]



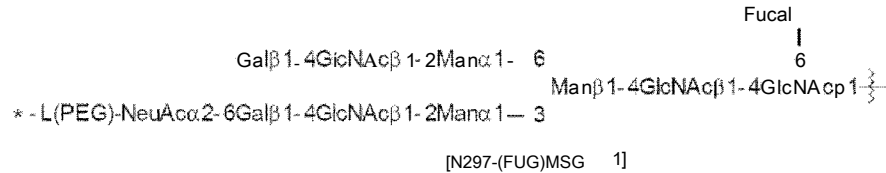
から選ばれ、

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

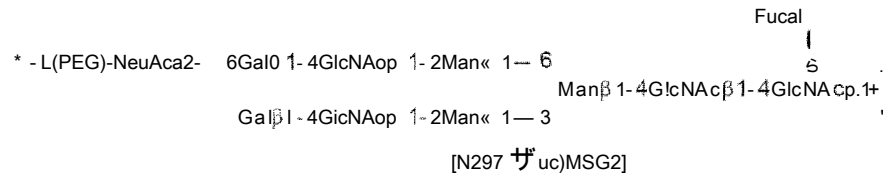
Abは、請求項30～42、50～54及び58のいずれか一つに記載の抗体もしくは該抗体の機能性断片又は抗HER2抗体であることを示し、

AbのN297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2もしくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであることを示し、

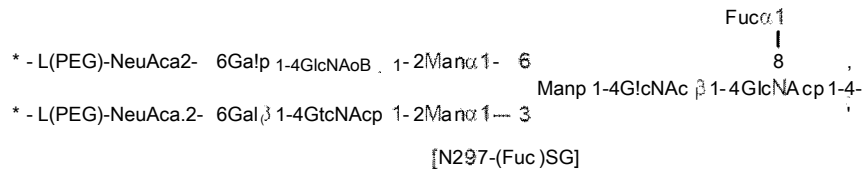
[化35]



[化36]



[化37]



式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

L(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-$ *であることを示し、ここで、左端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側又は/及び1-6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボン酸とアミド結合していることを示し、アステリスクは、それぞれの構造式におけるトリアゾール環上の1位又は3位の窒素原子と結合していることを示す、抗体-薬物コンジュゲート。

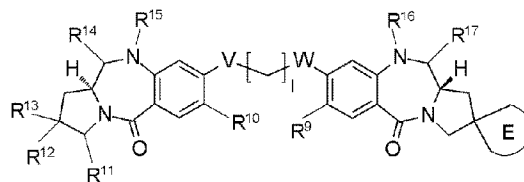
[請求項61]

抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1〜3又は3〜5である、請求項1〜29、59〜60のいずれか一つに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[請求項62]

次式

[化 38]



(式中、 l は、2から8の整数を示し、

E は、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3～5員の飽和炭化水素環、又は3～5員の飽和複素環を示し、

R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、 C_1 ～ C_6 アルコキシ基、 C_1 ～ C_6 アルキル基、水素原子、水酸基、チオール基、 C_1 ～ C_6 アルキルチオ基、ハロゲン原子又は $-NR'R''$ を示し、

ここで、 R' 及び R'' は、それぞれ独立して、水素原子又は C_1 ～ C_6 アルキル基を示し、

R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} は、下記 (1) ～ (4) から選択され、

(i) R^{11} 及び R^{12} が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子とともに、二重結合を形成し、

R^{13} は、群7から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群8から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 ～ C_6 アルキル基を示す、

(ii) R^{11} は、水素原子を示し、

R^{12} 及び R^{13} が、 R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒に、3～5員の飽和炭化水素環もしくは3～5員の飽和複素環又は $CH_2=$ を形成する、又は、

(4) R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} が、 R^{11} が結合している炭素原子並びに R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒に、群9から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環又は6員の複素環を形成する、

R^{13} は、単結合を示す、

R^{14} 及び R^{15} は、共に水素原子を示すか、 R^{14} 及び R^{15} が一緒になって、イミン結合 ($C = N$) であることを示し、

R^{16} 及び R^{17} は、下記 (a) 又は (b) を示し、

(a) R^{16} 及び R^{17} が一緒になって、イミン結合 ($N = C$) を形成する、

(b) R^{16} は、 $J - La' - Lp' - NH - B' - CH_2 - O (C = O) - *$

式中、アステリスクは、 R^{16} に隣接する窒素原子に結合していることを示し、

B' はフェニル基又はヘテロアリール基を示し、

Lp' は、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示し、

La' は、以下の群：

- $C(=O) - (CH_2CH_2)^{n^6} - C(=O) -$ 、 $- C(=O) - (CH_2CH_2)^{n^6} - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)^{n^7} - C(=O) -$ 、

- $C(=O) - (CH_2CH_2)^{n^6} - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)^{n^7} - CH_2 - C(=O) -$ 、

- $C(=O) - (CH_2CH_2)^{n^6} - NH - C(=O) - (CH_2CH_2)^{n^7} - CH_2CH_2 - C(=O) -$ 、 $- (CH_2)^{n^8} - O - C(=O) -$ 、

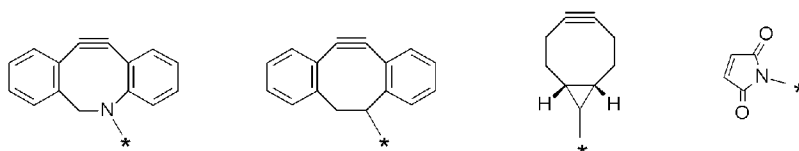
- $(CH_2)^{n^{12}} - C(=O) -$ 、及び、 $- (CH_2CH_2)^{n^{13}} - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)^{n^{14}} - CH_2CH_2 - C(=O) -$

から選択されるいずれか一つを示し、

ここで、式中、 n^6 は 1〜3 の整数、 n^7 は 1〜5 の整数、 n^8 は 0〜2 の整数、 n^{12} は 2〜7 の整数、 n^{13} は 1〜3 の整数、 n^{14} は 6〜10 の整数を示し、

J は、以下で示されるいずれか一つを示し、

[化39]



ここで、上記で示される J の構造式において、アステリスクは La'

と結合していることを示し、

R^{17} は、水酸基又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基であることを示し、

V及びWは、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子、又は硫黄原子であり、

群7は、a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルコキシ基、

b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-C(=NR')$ 、 $-N(R')R''$ 及び $-N(R')R''$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基、

c) ハロゲン原子、

d) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、

e) C_1 〜 C_6 アルキルチオ基、

f) $-NR'R''$ 、

g) $-C(=NR')$ 、 $-NR''R'''$ 、

h) $-NHC(=NR')$ 、 $-NR''R'''$ 、

i) $-NHCOR'$ 、又は

j) 水酸基を示し、

ここで、 R' 及び R'' は、前で定義した通りであり、 R''' はそれぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_6 アルキル基を示し、

群8は、ハロゲン原子、水酸基、又は C_1 〜 C_6 アルコキシ基を示し、並びに、

群9は、ハロゲン原子、又は1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_6 アルキル基もしくは C_1 〜 C_6 アルコキシ基を示す)

で示される化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項63]

Eが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^9 及び R^{10} が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^{11} 及び R^{12} が一緒になって、それぞれの基が結合する炭素原子と

もに二重結合を形成し、

R^{13} が、群10から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいアリール基もしくはヘテロアリール基、又は群11から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基であることを示し、

V及びWが、酸素原子であり、

群10は、a) 1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルコキシ基、

b) 1〜3個のハロゲン原子、水酸基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')-NR''R$ 、及び $-NHC(=NR')-NR''R'$ から選択されるいずれか一つで置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基、

c) C_3 〜 C_5 シクロアルコキシ基、

d) $-C(=NR')-NR''R'$ 、

e) $-NHC(=NR')-NR''R'$ 、又は

f) 水酸基を示し、

ここで、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C_1 〜 C_3 アルキル基を示し、並びに、

群11は、ハロゲン原子、水酸基、又は C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示す、請求項62に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項64] Eが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^9 及び R^{10} が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^{11} が、水素原子を示し、

R^{12} 及び R^{13} が、 R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒にあって、3〜5員の飽和炭化水素環又は $CH_2=$ を形成し、並びに、

V及びWが、酸素原子である、請求項62に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項65] Eが、1〜2個のハロゲン原子で置換されていてもよいスピロ結合の3

〜5員の飽和炭化水素環を示し、

R^9 及び R^{10} が、それぞれ独立して、 C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示し、

R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} が、 R^{11} が結合している炭素原子並びに R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒にあって、群12から選択される1もしくは複数個の置換基を有していてもよいベンゼン環を形成し、

V及びWが、酸素原子であり、並びに、

群12は、ハロゲン原子、又は1〜3個のハロゲン原子で置換されていてもよい C_1 〜 C_3 アルキル基もしくは C_1 〜 C_3 アルコキシ基を示す、請求項62に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項66] B' が、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、2,5-チエニル基から選択されるいずれか一つである、請求項62〜65のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項67] B' が、1,4-フェニル基である、請求項66に記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項68] Lp' が、以下の群：
 -GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、-GG(D-)P-I-、及び
 -GGPL-から選択されるアミノ酸残基である、請求項62〜67のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項69] La' が、以下の群：
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、-OC(=O)-、-(CH₂)₅-C(=O)-、及び、-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₈-CH₂CH₂-C(=O)-

から選択される、請求項62〜68のいずれか一つに記載の化合物、その

塩、又は、それらの水和物。

[請求項70]

R^{16} が、 $J-La'-Lp'-NH-B'-CH_2-O-C(=O)-*$ で示され、

式中、 B' は、1,4-フェニル基であり、

Lp' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

-GGVA-、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG-、-GGPI-、-GGVCit-、-GGVK-、
及び、-GGPL-、

La' は、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、-C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-、

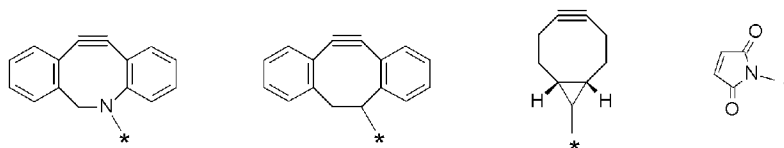
-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-、

-C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-、-CH₂-OC(=O)-、-OC(=O)-、

-(CH₂)₅-C(=O)-、及び、-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₈-CH₂CH₂-C(=O)-
、並びに、

J は、以下で示されるいずれか一つを示し、

[化40]



ここで、 J の構造式において、アステリスクは La' と結合していることを示す、請求項62～69のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項71]

R^{16} が、以下の群：

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

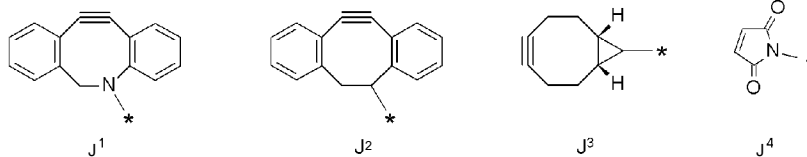
$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVC i t-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVK-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGPL-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^2 -OC(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^3 -CH₂-OC(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^4 -(CH₂)₅-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^4 -(CH₂)₅-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、及び
 J^4 -CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₈-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-
 から選択され、

ここで、J、J²、J³、J⁴は、以下の構造式：

[化41]



を示し、

ここで、J、J²、J³及びJ⁴の構造式において、アステリスクは隣接する基と結合していることを示し、並びに、

B' は、1,4-フェニル基である、請求項62〜70のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項72]

が⁶が、以下の群：

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、
 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-GGVCit-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、 J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-

C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂)₂-CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、

J^1 -C(=O)-CH₂CH₂-NH-C(=O)-(CH₂CH₂)₄-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

J^4 -(CH₂)₅-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-、及び

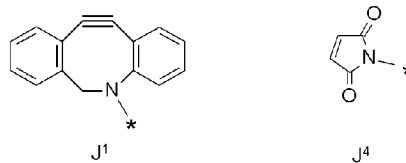
J^4 -(CH₂)₅-C(=O)-VA-NH-B'-CH₂-OC(=O)-

から選択され、

ここで、B' は 1,4-フェニル基であり、

J^1 、 J^4 は以下の構造式を示し、

[化 42]

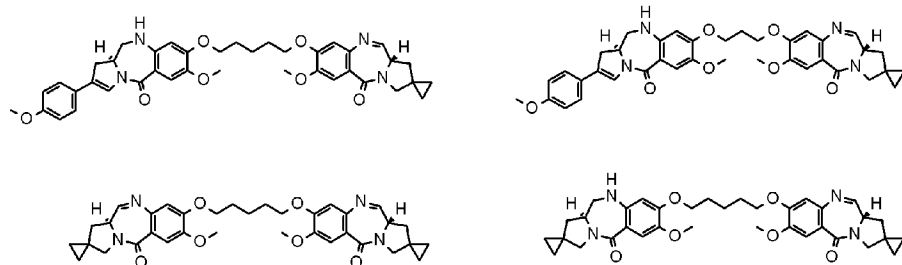


ここで、 J^1 及び J^4 の構造式において、アステリスクは隣接する基と結合していることを示す、請求項62〜71のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又は、それらの水和物。

[請求項73]

次式：

[化 43]

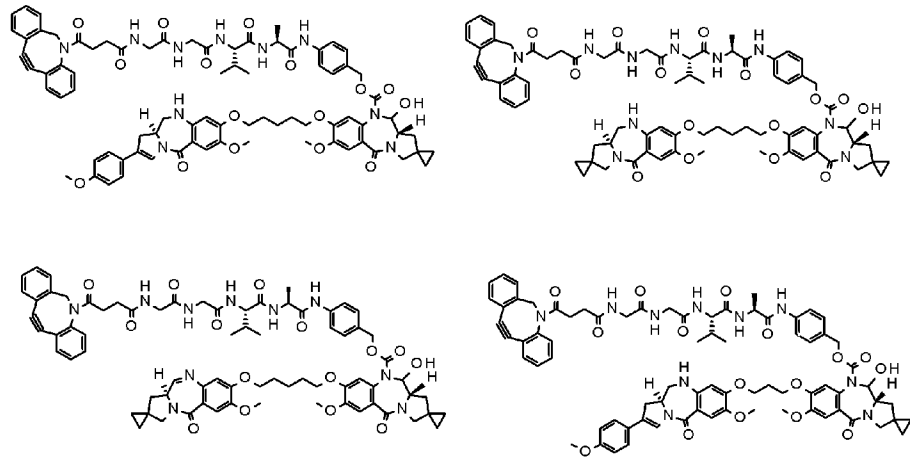


で示されるいずれか一つの化合物、その塩、又はそれらの水和物。

[請求項74]

次式：

[化 44]



で示されるいずれか一つの化合物、その塩、又はそれらの水和物。

[請 求 項 75] 請 求 項 1～29 及 び 59～61 の い ず れ か 一 つ に 記 載 の 抗 体 - 薬 物 コ ン ジ ュ ゲ ー ト、その塩、又はそれらの水和物、請求項 30～42、50～54 及び 58 の い ず れ か 一 つ に 記 載 の 抗 体 又 は 該 抗 体 の 機 能 性 断 片、及 び、請 求 項 62～74 の い ず れ か 一 つ に 記 載 の 化 合 物、その塩、又はそれらの水和物 から選 択 され る い ず れ か を 含 む こ と を 特 徴 と す る 医 薬 組 成 物。

[請 求 項 76] 抗 腫 瘍 薬 である こと を 特 徴 と す る、請 求 項 75 の い ず れ か 一 つ に 記 載 の 医 薬 組 成 物。

[請 求 項 77] 腫 瘍 が CLDN6 及 び / 又 は CLDN9 が 発 現 し て い る 腫 瘍 である こと を 特 徴 と す る、請 求 項 76 に 記 載 の 医 薬 組 成 物。

[請 求 項 78] 腫 瘍 が 卵 巢 癌 (表 層 上 皮 性 腫 瘍、間 質 性 腫 瘍、胚 細 胞 腫 瘍)、肺 癌 (非 小 細 胞 肺 癌、小 細 胞 肺 癌)、胃 癌、子 宮 体 癌、精 巢 癌 (セ ミ ノ ー マ、非 セ ミ ノ ー マ)、子 宮 頸 癌、胎 盤 絨 毛 癌、腎 癌、尿 路 上 皮 癌、大 腸 癌、前 立 腺 癌、多 形 神 經 膠 芽 腫、脳 腫 瘍、膵 癌、乳 癌、メ ラ ノ ー マ、肝 癌、膀 胱 癌 又 は 食 道 癌 である こと を 特 徴 と す る、請 求 項 76 又 は 77 に 記 載 の 医 薬 組 成 物。

[請 求 項 79] 請 求 項 1～29 及 び 59～61 の い ず れ か 一 つ に 記 載 の 抗 体 - 薬 物 コ ン ジ ュ ゲ ー ト、その塩、又はそれらの水和物、請求項 30～42、50～54 及び 58 の い ず れ か 一 つ に 記 載 の 抗 体 又 は 該 抗 体 の 機 能 性 断 片、及 び、請 求

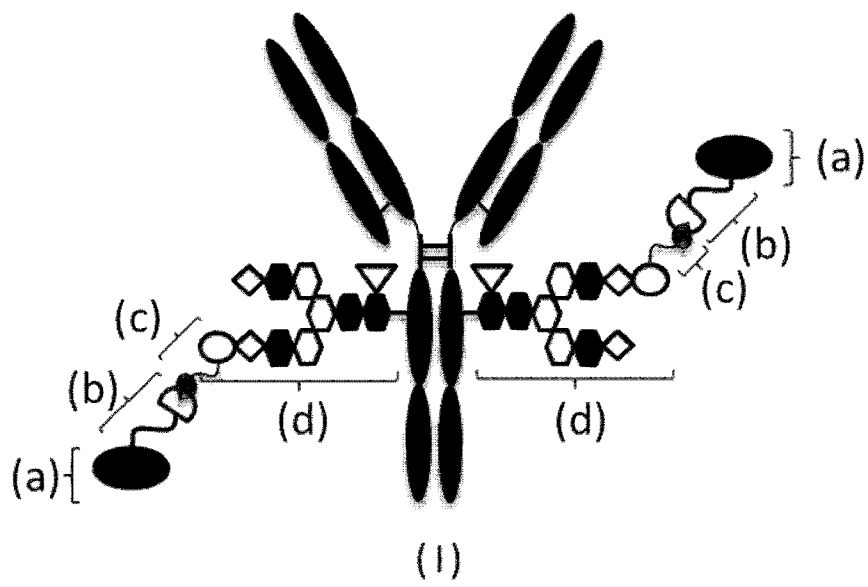
項62～74のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又はそれらの水和物から選択されるいずれかを個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[請求項80] 腫瘍がCLDN6及び/又はCLDN9が発現している腫瘍であることを特徴とする、請求項79に記載の腫瘍の治療方法。

[請求項81] 腫瘍が、卵巣癌（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌）、胃癌、子宮体癌、精巣癌（セミノーマ、非セミノーマ）、子宮頸癌、精巣癌、胎盤絨毛癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、脳腫瘍、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌又は食道癌であることを特徴とする、請求項79又は80に記載の治療方法。

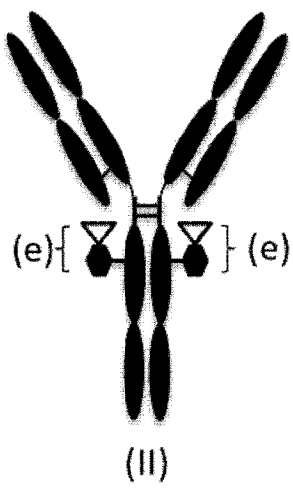
[請求項82] 請求項1～29及び59～61のいずれか一つに記載の抗体—薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物、請求項30～42、50～54及び58のいずれか一つに記載の抗体又は該抗体の機能性断片、及び、請求項62～74のいずれか一つに記載の化合物、その塩、又はそれらの水和物から選択される少なくとも一つを含む医薬組成物、及び少なくとも一つの抗腫瘍薬を、同時に、別々に又は連続して個体に投与することを特徴とする腫瘍の治療方法。

[図1]

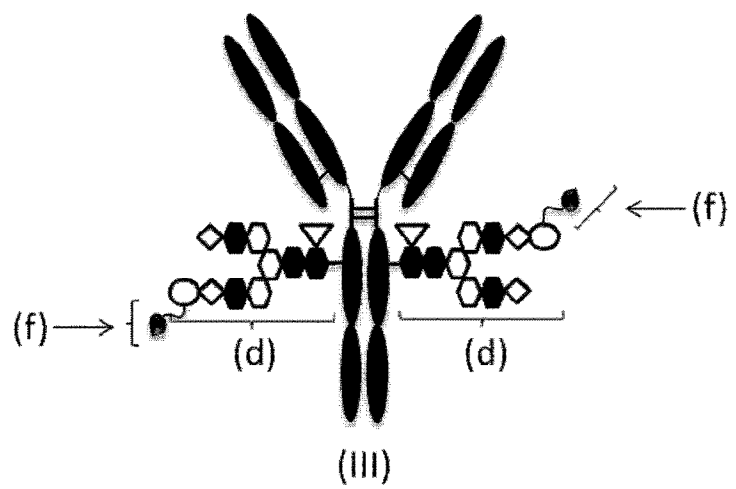


[図2]

A

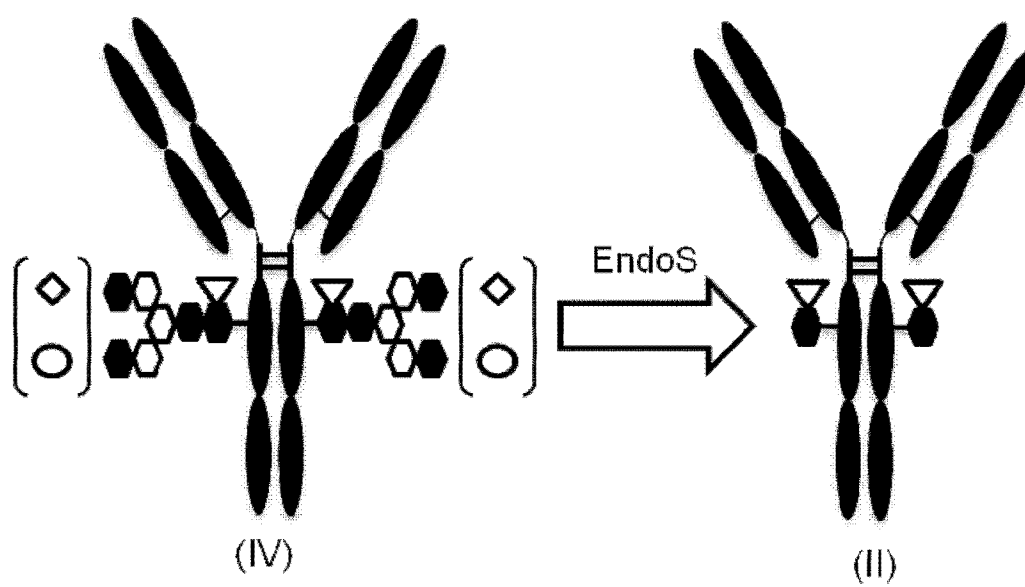


B

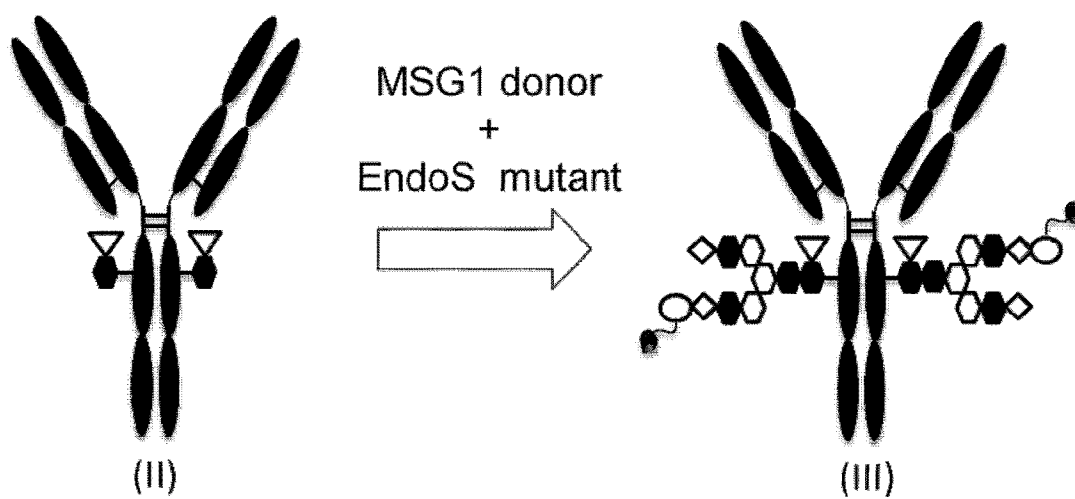


[図3]

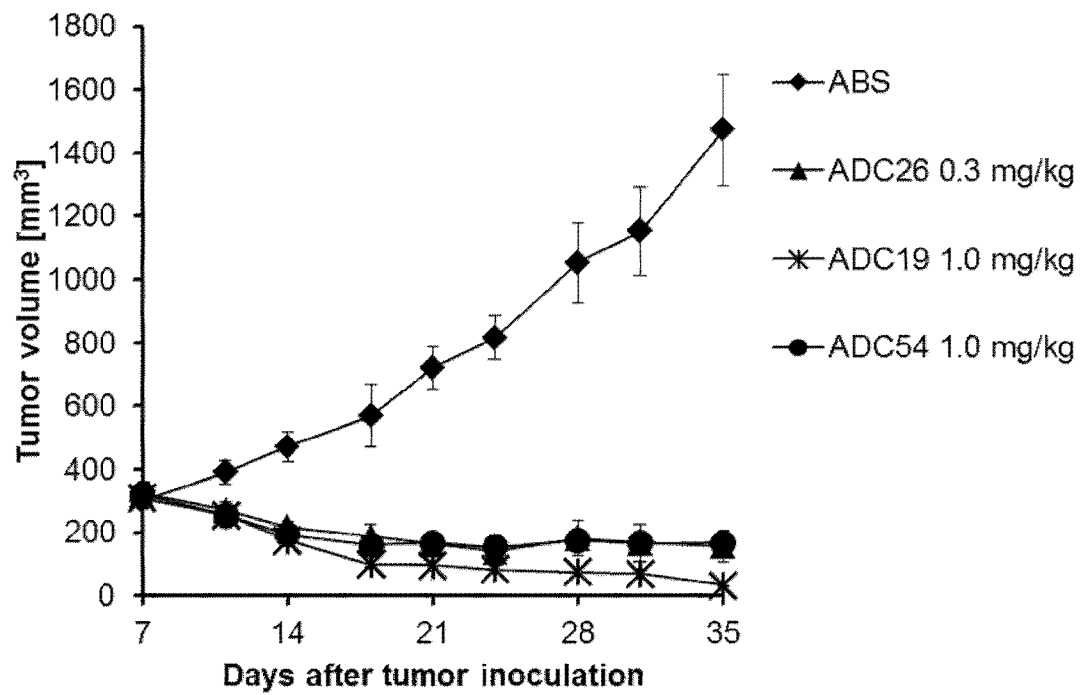
A



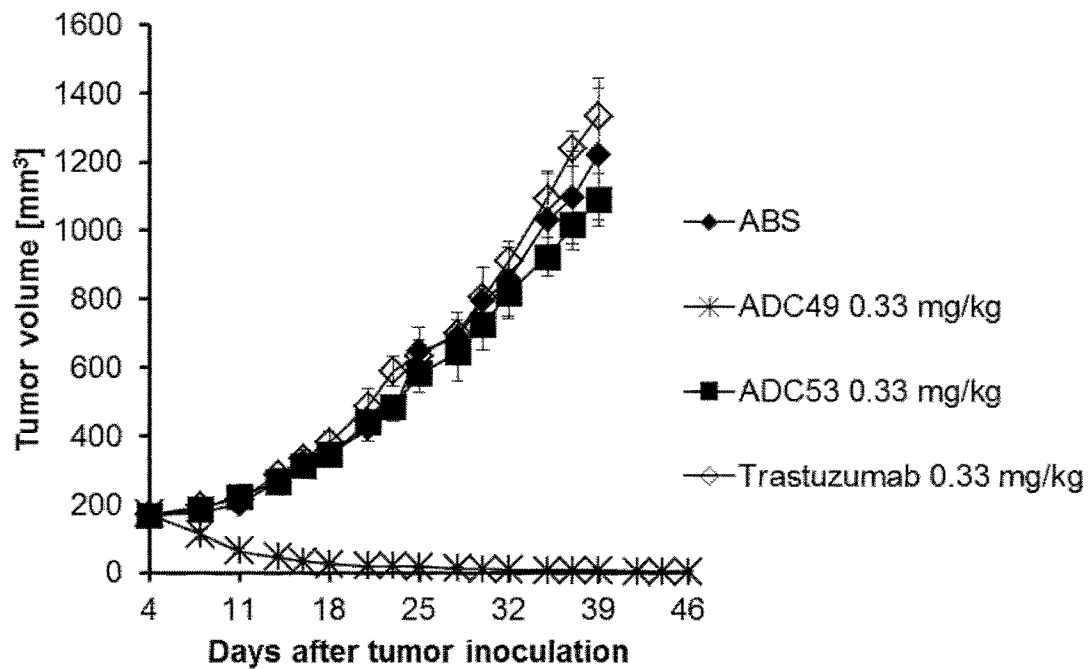
B



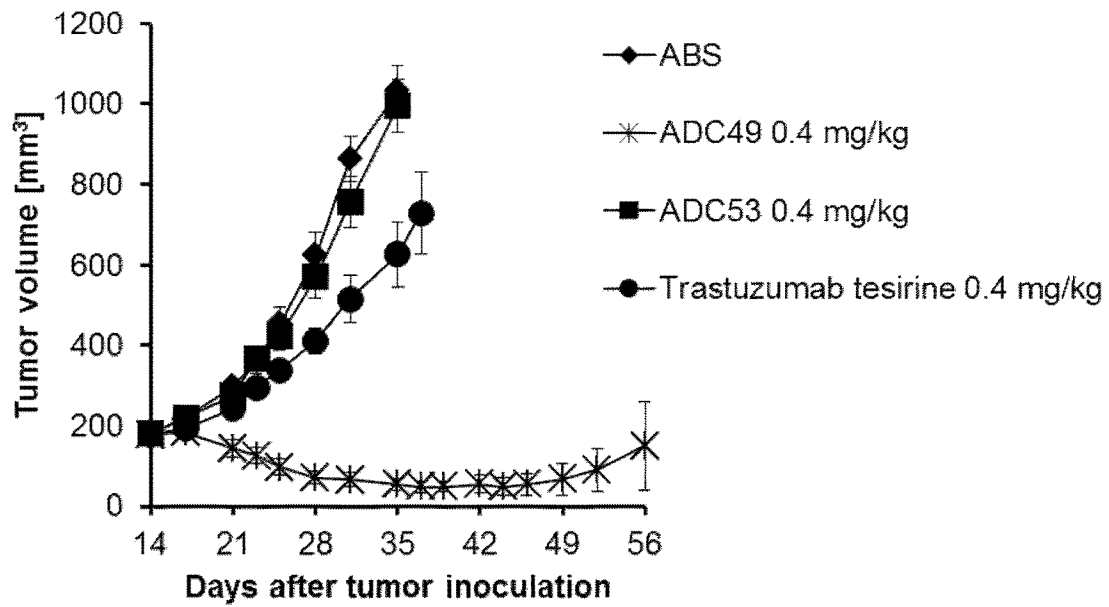
[図4]



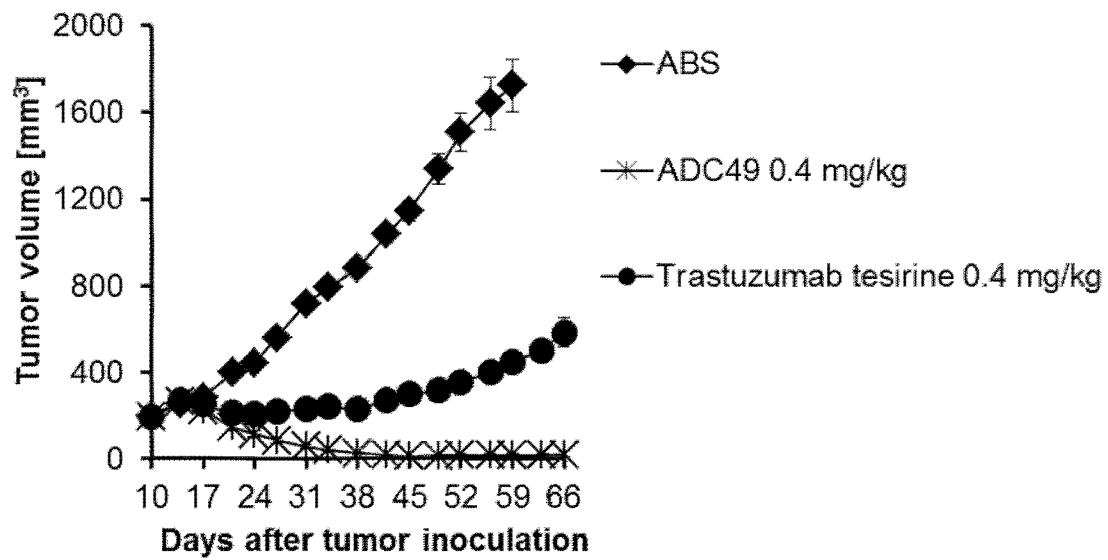
[図5]



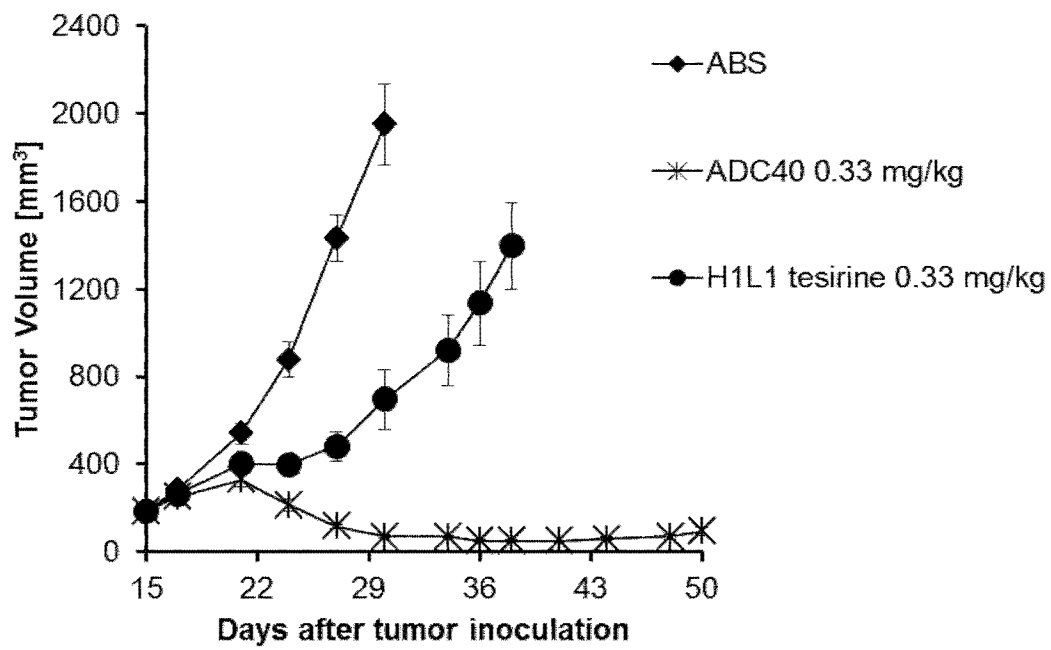
[図6]



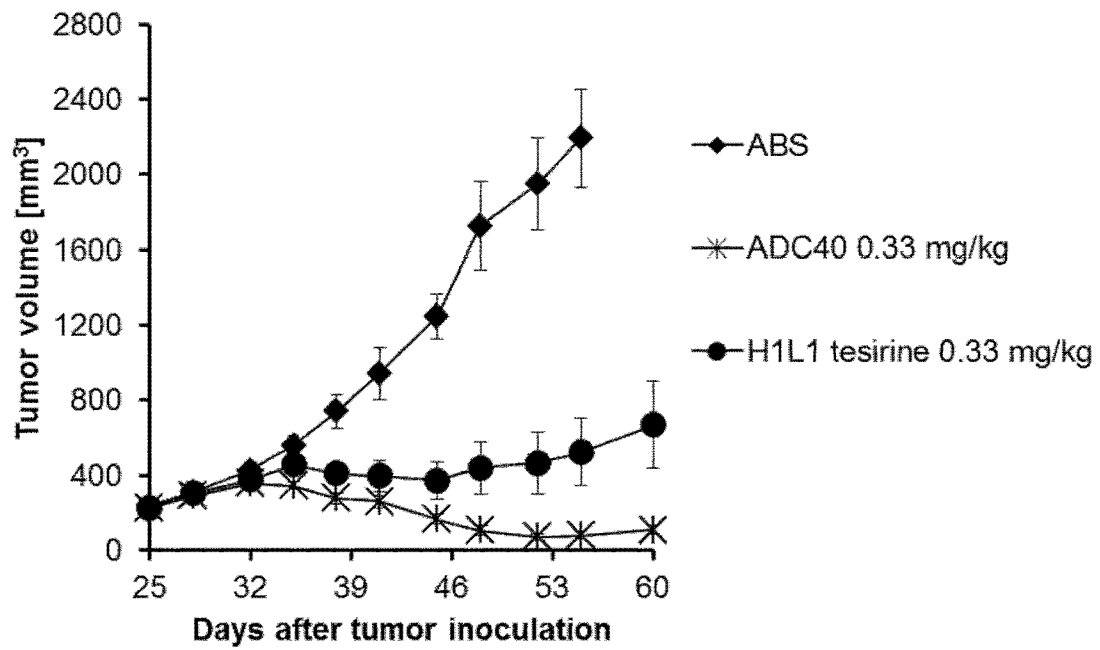
[図7]



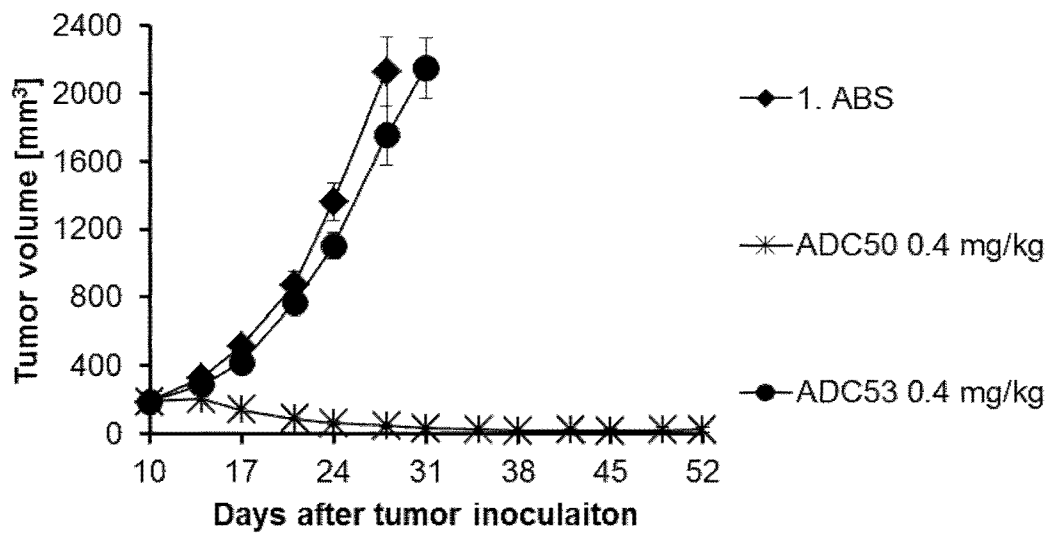
[図8]



[図9]



[図10]



[図11]

ヒトCLDN6の全長アミノ酸配列 (配列番号1)

MASAGMQLGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMCKVYDSL
LALPQDLQAARALCVIALLVALLVLFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLPVCWTA
HAIIRDFFYNPLVAEAQKRELGLASLYLGWAASGLLLLGGGLLCCTCPSGGSQGPHYMARYSTSAPAIISRG
PSEYPTKNYV

ヒトCLDN6の全長cDNAの塩基配列 (配列番号2)

atggcctctgccggaatgcagatcctgggagtcgtcctgacactgctgggctgggtgaatggcctgggtc
cctgtgccctgcccattgtggaaggtgaccgctttcatcggaacagcatcgtggtggcccagggtggtgtg
ggagggcctgtggatgtcctgcgtgggtgcagagcaccggccagatgcagtgaaggtgtacgactcactg
ctggcgtgccacaggacctgcaggtgcacgtgccctctgtgtcatcgccctccttgtggccctgttctg
gcttgcctggtctaccttgcctggggccaagtgtaccacctgtgtggaggagaaggattccaaggeccgct
ggtgctcactctgggattgtctttgtcatctcaggggtcctgacgctaataccccgtgtgctggacggcg
catgccatcatccgggaacttctataacccccctggtggctgaggcccaaaagcgggagctgggggcctccc
tctacttgggctggcgccctcaggccttttctgtgctgggtgggggttgcctgtgctgcacttgcctctc
gggggggtcccaggggcccccagccattacatggcccgtactcaacatctgcccctgccatctctcggggg
ccctctgagtaccctaccaagaattacgtctga

[図12]

ヒトCLDN9の全長アミノ酸配列（配列番号3）

MASTGLELLGMTLAVLGWLGTLVSCALPLWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMCKVY
DSLALPQDLQAARALCVIALLLALLGLLVAITGAQCTTCVEDEGAKARIVLTAGVILLLAGILVLI
PVCWTAHAI IQDFYNPLVAEALKRELGASLYLGWAAAALLMLGGLLCCTCPPPQVERPRGPRLGYS
IPSRSGASGLDKRDYV

ヒトCLDN9の全長cDNAの塩基配列（配列番号4）

atggcttcgaccggccttagaactgctgggcatgaccctggctgtgctgggctggctggggaccctgg
tgtcctgcgccttgccctgtggaaggtgaccgccttcacgcgcaacagcatcggtggccaggt
gggtgtgggagggcctgtggatgtcctgcgtgggtgcagagcacgggccagatgcagtgaaggtgtac
gactcactgctggctctgccgcaggacctgcaggccgcacgtgccctctgtgtcattgccctcctgc
tggccctgcttgccctcctgggtggccatcacaggtgccagtgaccacgtgtgtggaggacgaagg
tgccaaggcccgatcgtgtctcaccgcgggggtcctcctcctcctgcgcggcatcctgggtgtctac
cctgtgtgctggacggcgacgccatcatccaggacttctacaacccccctgggtggctgaggccctca
agcgggagctgggggcctccctctacctgggctgggcggcggtgcactgcttatgctgggcggggg
gtcctcctgtgtgcacgtgccccccgccccaggtcgagcggccccgcggacctcggtgggtactcc
atccccctcccgctcggtgcatctggactggacaagagggactacgtgtga

[図13]

B1抗体軽鎖のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号5）

RASQDINNYLN

B1抗体軽鎖のCDRL2のアミノ酸配列（配列番号6）

FTSRLHS

B1抗体軽鎖のCDRL3のアミノ酸配列（配列番号7）

QQGYPLPWT

[図14]

ヒト化B1抗体軽鎖L4のCDRL3のアミノ酸配列（配列番号8）

QQGNTLPWT

[図15]

B1抗体重鎖のCDRH1のアミノ酸配列（配列番号9）

GYTFTEYTMH

B1抗体重鎖のCDRH2のアミノ酸配列（配列番号10）

GVNPNSGDTS

B1抗体重鎖のCDRH3のアミノ酸配列（配列番号11）

PGGYDVGYYAMDY

[図16]

C 7 抗体軽鎖のCDRL 1のアミノ酸配列（配列番号 1 2）

RASQDINNYLN

C 7 抗体軽鎖のCDRL 2のアミノ酸配列（配列番号 1 3）

STSRLHS

C 7 抗体軽鎖のCDRL 3のアミノ酸配列（配列番号 1 4）

QQGYPLPWT

[図17]

C 7 抗体重鎖のCDRH 1のアミノ酸配列（配列番号 1 5）

GYTFTEYTMH

C 7 抗体重鎖のCDRH 2のアミノ酸配列（配列番号 1 6）

GVNPNSGDT S

C 7 抗体重鎖のCDRH 3のアミノ酸配列（配列番号 1 7）

PGGYDVGYYAMDY

[図18]

B 1 抗体軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列（配列番号 1 8）

GATATCCAGATGACACAGACTGCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTTGGAGACAGAGTCACCATCAGTT
GCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAA
ACTCCTGATCTACTTCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGAACACATTATTCTCTCACCATTACTAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAAC
AGGGTTATCCGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAACCTGGAAATCAAA

B 1 抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 1 9）

DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK

[図19]

B 1 抗体重鎖の可変領域をコードする cDNA のヌクレオチド配列 (配列番号 20)

GAGGTCCAGCTTCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCA
AGACTTCTGGATACACATTCACCTGAATACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCT
TGAGTGGATTGGAGGTGTTAATCCTAATAGTGGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGG
ATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCCGGGGGTACGACGTGGGTACTATGCTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

B 1 抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 21)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGK
ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSTVTVSS

[図20]

C 7 抗体軽鎖の可変領域をコードする cDNA のヌクレオチド配列 (配列番号 22)

GATATCCAGATGACACAGACTGCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTTGGAGACAGAGTCACCATCAGTT
GCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAA
ACTCCTGATCTACTCCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCT
GGAACACATTATTCTCTCACCATTACTCACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAAC
AGGGTTATCCGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAACCTGGAAATCAAA

C 7 抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 23)

DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYSTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYSLTITHLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK

[図21]

C 7 抗体重鎖の可変領域をコードする cDNA のヌクレオチド配列 (配列番号 24)

GAGGTCCAGCTTCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCA
AGACTTCTGGATACACATTCACCTGAATACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCT
TGAGTGGATTGGAGGTGTTAATCCTAATAGTGGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGG
ATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCCGGGGGTACGACGTGGGTACTATGCTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

C 7 抗体重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 25)

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGK
ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSTVTVSS

[図22]

c h B 1 軽鎖アミノ酸配列（配列番号 28）

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIKRAVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTIL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列(1-20)、軽鎖可変領域(21-127)、軽鎖定常領域(128-234)

c h B 1 軽鎖のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むDNA断片（配列番号 29）

ccagcctccgactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGG
ATCAGCGGCGCCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGACAGCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCG
ATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA
ACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGA
TTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCCACTACAGCCTGACCATCACCAACCTGGAACAGGAAGATATCG
CTACCTACTTCTGTGTCAGCAAGGCTACCCCTGCCCTGGACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAAT
CAAGCGGGCCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTTCCACCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC
ACAGCTAGCGTCTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG
ACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA
CTCCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAA
GTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGCGAGTGTtgagttttaa
cgggggaggctaact

シグナル配列(26-85)、軽鎖可変領域(86-406)、軽鎖定常領域(407-727)

[図23]

c h B 1 軽鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 30）

DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK

c h B 1 軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 31）

GACATCCAGATGACCCAGACAGCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCT
GCAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT
GGCACCCACTACAGCCTGACCATCACCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGC
AAGGCTACCCCTGCCCTGGACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAG

[図24]

c h B 1 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 3 2)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWI
 GGVNPNNSGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
 TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

シグナル配列 (1-19)、重鎖可変領域 (20-141)、重鎖定常領域 (142-471)

c h B 1 重鎖をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 3 3)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCAGC
 TGCAGCAGTCTGGCCCCGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGACCAGCGG
 CTACACCTTCACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGATC
 GCGGCGGTGAACCCCCAACAGCGGCGACACCAGCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGA
 CCGTGACAAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGT
 GTACTACTGTGCCAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
 ACCAGCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCCGCTGTCTTGCAGTCTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CCAAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAAA

シグナル配列 (1-57)、重鎖可変領域 (58-423)、重鎖定常領域 (424-1413)

[図25]

c h B 1 重鎖の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 3 4）

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNNSGDTSYNQKFKGK
ATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTSTVTVSS

c h B 1 重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 3 5）

GAAGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCCGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCA
AGACCAGCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCT
GGAATGGATCGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGACACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCAGCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGACCAGCGAGG
ACAGCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCCAGCGTGACCGTCAGCTCA

[図26]

ヒト化抗体軽鎖 hL1 のアミノ酸配列（配列番号 3 6）

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLL
IYFTSRLHSGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列(1-20)、軽鎖可変領域(21-127)、軽鎖定常領域(128-234)

ヒト化抗体軽鎖 hL1 をコードするヌクレオチド配列（配列番号 3 7）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTA
CCCCCTGCCTTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACCTC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

シグナル配列(1-60)、軽鎖可変領域(61-381)、軽鎖定常領域(382-702)

[図27]

ヒト化抗体軽鎖 hL1 の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 38）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIK

ヒト化抗体軽鎖 hL1 の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 39）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCAAGGCCCCCAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCTACCCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

[図28]

ヒト化抗体軽鎖 hL2 のアミノ酸配列（配列番号 40）

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTHYTLTISLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列 (1-20)、軽鎖可変領域 (21-127)、軽鎖定常領域 (128-234)

ヒト化抗体軽鎖 hL2 をコードするヌクレオチド配列（配列番号 41）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCGTGAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCC
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTA
CCCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

シグナル配列 (1-60)、軽鎖可変領域 (61-381)、軽鎖定常領域 (382-702)

[図29]

ヒト化抗体軽鎖 hL2 の可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 4 2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTHYTLTISSLPEDFATYYCQQGYPLPWTFGQGTKVEIK

ヒト化抗体軽鎖 hL2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 4 3)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCT
GGCACCCACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCTACCCCTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

[図30]

ヒト化抗体軽鎖 hL3 のアミノ酸配列 (配列番号 4 4)

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGYPLPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列 (1-20)、軽鎖可変領域 (21-127)、軽鎖定常領域 (128-234)

ヒト化抗体軽鎖 hL3 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 4 5)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTA
CCCCCTGCCCTGGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCTCC
GTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

シグナル配列 (1-60)、軽鎖可変領域 (61-381)、軽鎖定常領域 (382-702)

[図31]

ヒト化抗体軽鎖 hL3 の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 4 6）

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGYPLPWTFGGGTKVEIK

ヒト化抗体軽鎖 hL3 の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 4 7）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCTACCCCTGCCCTGGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

[図32]

ヒト化抗体軽鎖 hL4 のアミノ酸配列（配列番号 4 8）

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLL
IYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列 (1-20)、軽鎖可変領域 (21-127)、軽鎖定常領域 (128-234)

ヒト化抗体軽鎖 hL4 をコードするヌクレオチド配列（配列番号 4 9）

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGACATCC
AGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGC
CAGCCAGGACATCAACAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAAGCTGCTG
ATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCG
ACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCAA
CACCTGCCCTGGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCC
GTGTTTCATCTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATC
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTG
AGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCC
CCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

シグナル配列 (1-60)、軽鎖可変領域 (61-381)、軽鎖定常領域 (382-702)

[図33]

ヒト化抗体軽鎖 hL4 の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 50）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGGAVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLTPWTFGGGTKVEIK

ヒト化抗体軽鎖 hL4 の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 51）

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
GTAGAGCCAGCCAGGACATCAACAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCGGAGCCGTGAA
GCTGCTGATCTACTTCACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACCGACTACACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGGGCAACACCCTGCCCTGGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

[図34]

ヒト化抗体重鎖 hH1 のアミノ酸配列 (配列番号 5 2)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWM
 GGVNPNSGDTSYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYIAMDYWGQG
 TLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

シグナル配列 (1-19)、重鎖可変領域 (20-141)、重鎖定常領域 (142-471)

ヒト化抗体重鎖 hH1 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 5 3)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCAGC
 TGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTTGCAAGGCCAGCGG
 CTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATG
 GGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATCA
 CCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGT
 GTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
 ACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAAGTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACATAAGACCAACCCCTCCCGTGTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAA

シグナル配列 (1-57)、重鎖可変領域 (58-423)、重鎖定常領域 (424-1413)

[図35]

ヒト化抗体重鎖 hH1 の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 5 4）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGGVNPNSGDTSYAQKFQGR
VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTILVTVSS

ヒト化抗体重鎖 hH1 の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 5 5）

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACT
GGAATGGATGGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGA
GTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTCAGCTCA

[図36]

ヒト化抗体重鎖 hH2 のアミノ酸配列 (配列番号 5 6)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGKSLEWM
 GGVNPNNSGDTSYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
 TLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
 PKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

シグナル配列 (1-19)、重鎖可変領域 (20-141)、重鎖定常領域 (142-471)

ヒト化抗体重鎖 hH2 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 5 7)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCAGC
 TGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGACCAGCGG
 CTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAGAGCCTGGAATGGATG
 GCGGGCGTGAACCCCAACAGCGGCATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCA
 CCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGT
 GTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
 ACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAAA

シグナル配列 (1-57)、重鎖可変領域 (58-423)、重鎖定常領域 (424-1413)

[図37]

ヒト化抗体重鎖 hH2 の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 58）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFT⁵TEYTMHWVRQAPGKSLEWMGGVNPNSGDT¹⁰SYAQKFQGR
VTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGT¹⁵LVTVSS

ヒト化抗体重鎖 hH2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 59）

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCA
AGACCAGCGGCTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAGAGCCT
GGAATGGATGGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGA
GTGACCATCACCGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCTCGTGACCGTCAGCTCA

[図38]

ヒト化抗体重鎖 hH3 のアミノ酸配列 (配列番号 60)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSSGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWM
GGVNPNSGDTSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQG
 TLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

シグナル配列 (1-19)、重鎖可変領域 (20-141)、重鎖定常領域 (142-471)

ヒト化抗体重鎖 hH3 をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 61)

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTGCAGC
 TGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGACCAGCGG
 CTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATG
 GGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATACAAGCTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGA
 CCGTGGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGT
 GTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGC
 ACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
 AGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGAC
 CGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCCGCTGTCTTGCAGTCCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
 GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGGACCCTCAGTCTTCTTCTTCCCC
 CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
 AAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
 GGCAAA

シグナル配列 (1-57)、重鎖可変領域 (58-423)、重鎖定常領域 (424-1413)

[図39]

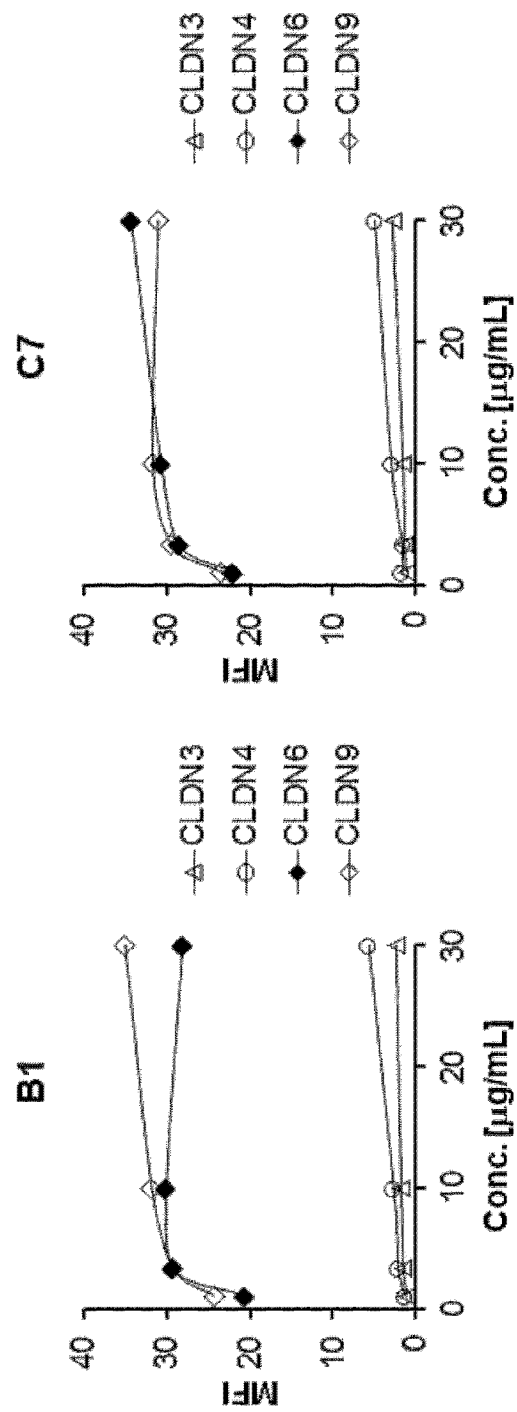
ヒト化抗体重鎖 hH3 の可変領域のアミノ酸配列（配列番号 6 2）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGGVNPNSGDTSYAQKFQGR
VTLLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGGYDVGYYAMDYWGQGTLLTVSS

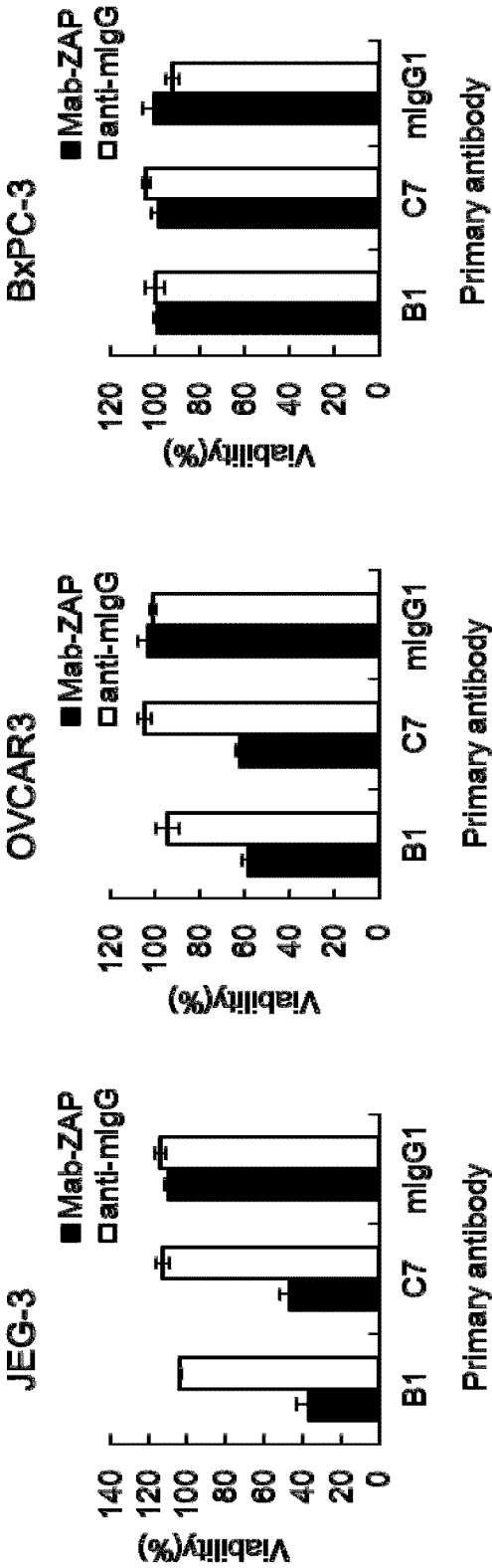
ヒト化抗体重鎖 hH3 の可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号 6 3）

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCA
AGACCAGCGGCTACACCTTTACCGAGTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGACT
GGAATGGATGGGCGGCGTGAACCCCAACAGCGGCGATAACAAGCTACGCCCAGAAATTCAGGGCAGA
GTGACCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGG
ACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGACCTGGCGGCTACGACGTGGGCTACTACGCCATGGATTACTG
GGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTCAGCTCA

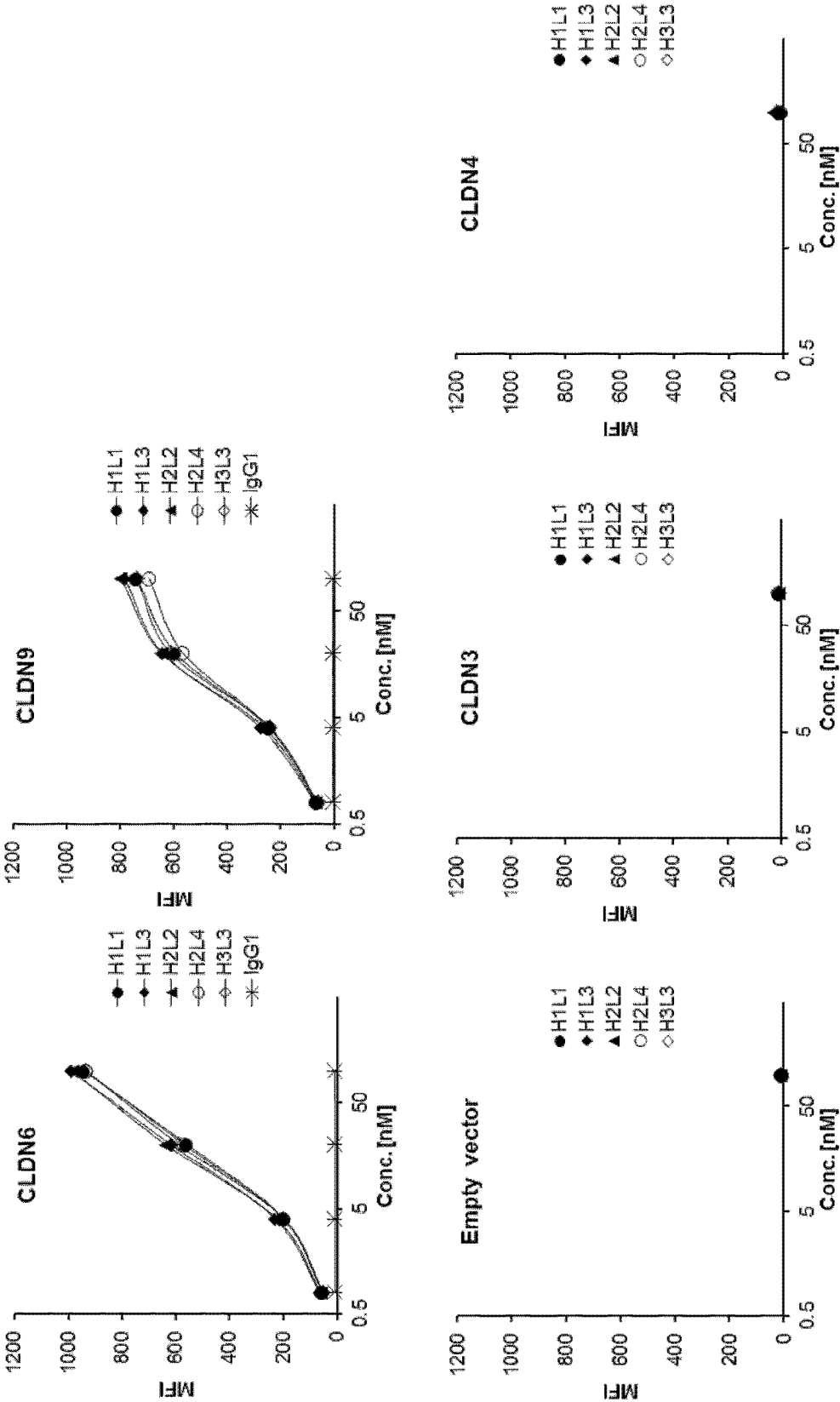
[図40]



[図41]



[図42]



[図43]

トラスツズマブ軽鎖のアミノ酸配列（配列番号 6 4）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

トラスツズマブ重鎖のアミノ酸配列（配列番号 6 5）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[図44]

トラスツズマブ変異体軽鎖のアミノ酸配列（配列番号 7 3）

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列(1-20)、軽鎖可変領域(21-127)、軽鎖定常領域(128-234)

トラスツズマブ変異体重鎖のアミノ酸配列（配列番号 7 5）

MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

シグナル配列(1-19)、重鎖可変領域(20-139)、重鎖定常領域(140-469)

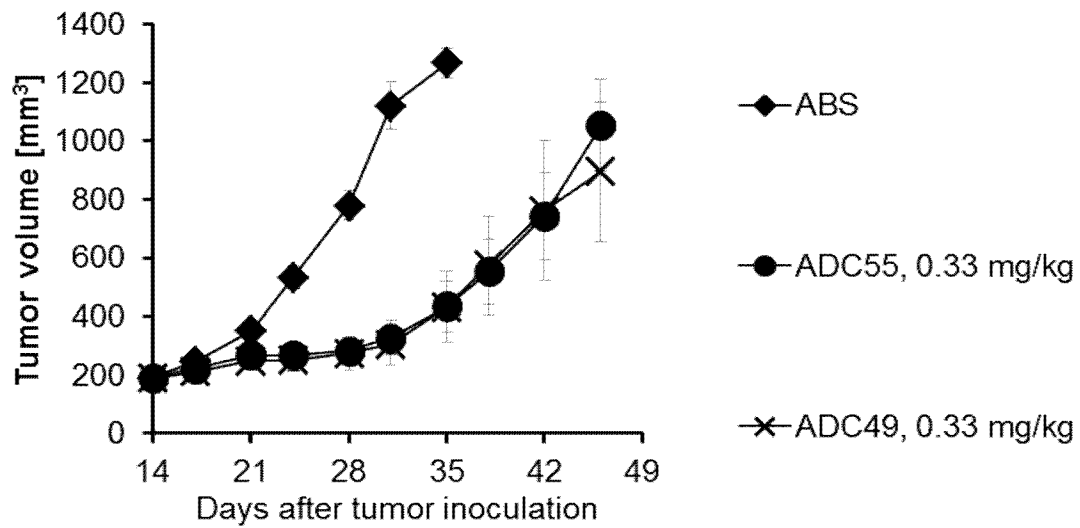
[図45]

chB1_H	1	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVQQSHGKSLEWIGGVNPNSGDTSYNQKFKGKATL	70
hH1	1	Q...V...A.VK.....V...A.....R.AP.QG...M.....A...Q.RV.I	70
hH2	1	V...V...A.VK.....V...A.....R.AP...M.....A...Q.RV.I	70
hH3	1	V...V...A.VK.....V...A.....R.AP.QG...M.....A...Q.RV..	70
chB1_H	71	TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARPGYDVGYAMDYWGQGTSTVTVSS	122
hH1	71	A.T.T.....S..R..T.....L.....	122
hH2	71	A.T.T.....S..R..T.....L.....	122
hH3	71	...T.....S..R..T.....L.....	122

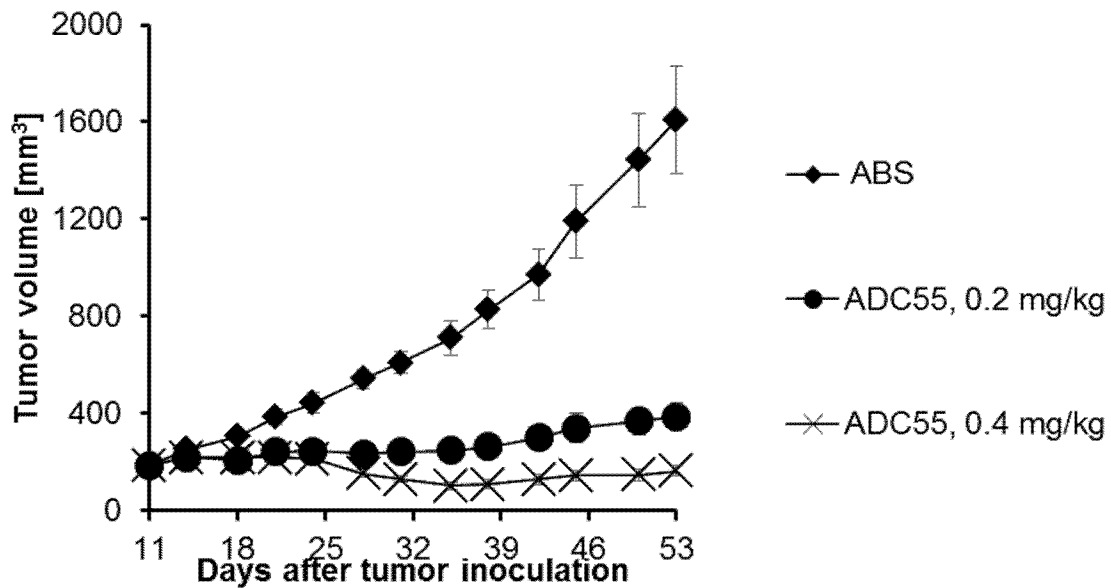
[図46]

chB1_L	1	DIQMTQTASSLSASLSGLDRVTISCRASQDINNYYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPS	60
hL1	1	SP.....V.....T.....GKAP.....	60
hL2	1	SP.....V.....T.....GKA.....	60
hL3	1	SP.....V.....T.....G.A.....	60
hL4	1	SP.....V.....T.....G.A.....	60
chB1_L	61	RFSGSGGTHYSLTITNLEQEDIATYFCQQGYPLPWTFGGGTKLEIK	107
hL1	61	D.T...SS.QP..F...Y.....Q...V...	107
hL2	61	T...SS.QP..F...Y.....Q...V...	107
hL3	61	D.T...SS.QP..F...Y.....V...	107
hL4	61	D.T...SS.QP..F...Y...NT.....V...	107

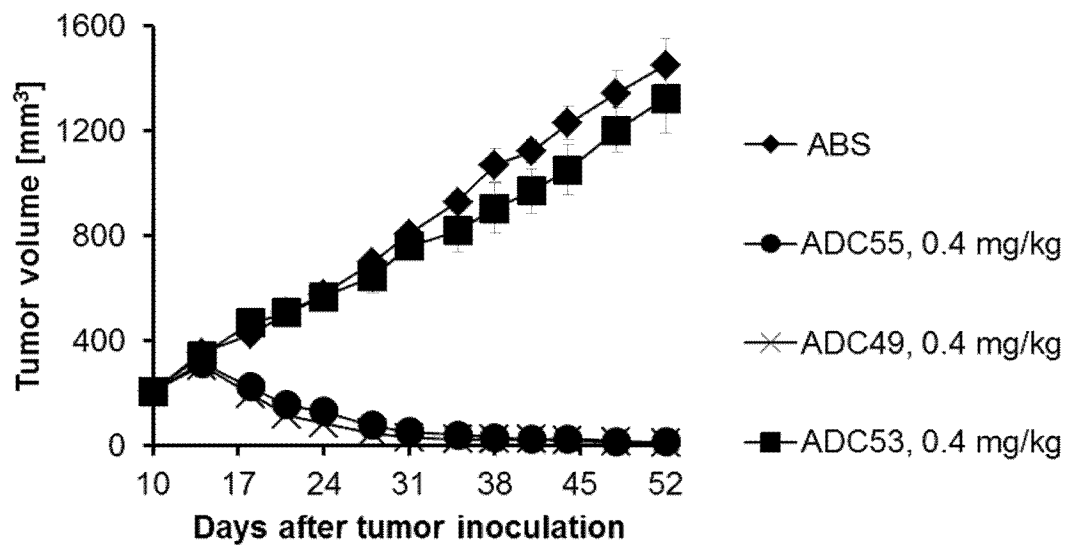
[図47]



[図48]



[図49]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP 2018 / 036252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N1 5/06 (2006.01)i, A61K3 1/5513 (2006.01)i, A61K3 5/00 (2006.01)i, A61K3 9/395 (2006.01)i, A61K4 7/68 (2017.01)i, C07D4 87/04 (2006.01)i, C07K1 6/00 (2006.01)i, C07K1 6/30 (2006.01)i, C12N5 / 10 (2006.01)i, C12P2 1/08 (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)

Int. Cl. C12N1 5/06, A61K3 1/5513, A61K3 5/00, A61K3 9/395, A61K4 7/68, C07D4 87/04, C07K1 6/00, C07K1 6/30, C12N5 / 10, C12P2 1/08

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018
Registered utility model specifications of Japan 1996-2018
Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTP lus / JMEDI lus / JST7580 (JDreaml ll), CAPlus / REGISTRY / MARPAT (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category: *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016- 536020 A (STEMCENTRX, INC.) 24 November 2016, abstract, claims, paragraph [0122] & US	30- 56, 58, 75- 82
Y	2016/ 0289332 AI & WO 2015/ 069794 A2, claims, page 16 & EP 3065776 A2	1- 29, 57, 59- 74
Y	US 2009/ 0149449 AI (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES ET AL.) 11 June 2009, claim 1, paragraph s [0034], [0146] & WO 2005/ 040170 A2 & EP 1675857 A2	1- 29, 57, 59- 74
Y	WO 2017/ 137556 AI (ADC THERAPEUTICALS SA) 17 August 2017, claims, pages 32, 33 & GB 201602363 A	1- 29, 57, 59- 74



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22.10.2018

Date of mailing of the international search report
06.11.2018

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/036252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category: ^k	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-534996 A (SYNAFFIX B.V.) 07 December 2015, claims, paragraph [0184] & US 2015/0320882 AI, abstract, paragraph [0232] & WO 2014/065661 AI & EP 2911699 AI	1-29, 57, 59-74
A	JP 2017-526614 A (X-RX, INC.) 14 September 2017, paragraph [0132] & US 2017/0037007 AI, paragraph [0205] & WO 2015/175171 AI & EP 3134079 AI	1-82
A	JP 2017-513942 A (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 01 June 2017, paragraph [0068] & US 2015/0291609 AI, paragraph [0162] & WO 2015/157123 AI & EP 3129377 AI	1-82
A	JP 2016-531893 A (BEIJING SYNERCARE PHARMA TECH CO., LTD.) 13 October 2016, paragraph [0712] & US 2016/0237075 AI, paragraph [0664] & WO 2015/048662 A2 & EP 3052476 A2	1-82

A 明の属する分類 際特許分類 (I		Im.Cl. C12N15/ (2 31/5513(2006. 1) i 1f 5 00(2006. 01) i 1K39/395(20 06. 01) i, A61K47/68(2017. 01) i, C07D487/ (2006. 01) i, C07K16/00(2006. 01) i, C12N5/10(2006. 01) i, C12P21/08(2006. 01) i	
B. 調査を行った分野		調査を行 最小限資料 際特 分類 (I	
調査を行 最小限資料 際特 分類 (I		Im.Cl. C12N15/06, A61K31/5513, 1f 5 00, 1K 395, 1K4 68, C07D487/04, C07K16/00, C07K16/30, C12N5/ , C12P21 08	
最小限資料以外の資料で調査を った分類 に含まれるもの		本 実用新案 1922-1936年 日本 開実用新案 1971-2018年 本 実用新案登 1996-2018年 本 登録実用新案 1994-2018年	
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		E1/	
C. 関連すると認められる文献		引用文献の カテゴリー*	
引用文献の カテゴリー*		引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2016-536020 A *	システムセトリックス, シー プ	30-6, 5, 75-2
Y	2016. 11. 24, 要約、特許請求の範囲、[O 1 2 2] & US 2016/028 2 A1 & 2015/069794 2, IM , p. 16 & 3065 6	A2	1-2, 57, 59-74
Y	U 2009/0149449 A1 The United States Patent and Hma S r et al.	2009. 06. 11, claim1, [0 34], [0146] & 2 /04 17 & EP 16	1-2, 57, 59-74
C 欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリ		「特 い ある文 > , 技術水 示す 「T 際出願日又は優 日後い 献であつ の日の後に公表された文献	
「 際出願日 の出願または特許である		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張を提起する文献又は他の文献の発行		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等而言及する文献		「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
2		4 N 3 6 3 3	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	W0 2017/137556 AI (ADC THERAPEUTICS SA) 2017. 08. 17, 特許請求 の範囲、第 3 2 , 3 3 頁 & GB 201602363 A	1-29, 57, 59-7 4
Y	JP 2015-534996 A (シニアフィックス ビー. ブイ.) 2015. 12. 07, 特許請求の範囲、[0 1 8 4] & US 2015/0320882 AI, ABSTRACT, [0232] & wo 2014/065661 AI & EP 2911699 AI	1-29, 57, 59-7 4
A	JP 2017-526614 A (エックスーアールエックス, インコーポレイ テッド) 2017. 09. 14, [0132] & US 2017/0037007 AI, [0205] & W0 2015/175171 AI & EP 3134079 AI	1-82
A	JP 2017-513942 A (ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ノース・キャロ ライナ'アト'チャペル'ヒル) 2017. 06. 01, [0068] & US 2015/0291609 AI, [0162] & wo 2015/157123 AI & EP 3129377 AI	1-82
A	JP 2016-531893 A (ベイジン・シナーケア・ファーマ'テク'-カ ンパニー、リミテッド) 2016. 10. 13, [0712] & US 2016/0237075 AI, [0664] & wo 2015/048662 A2 & EP 3052476 A2	1-82