(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5859964号
(P5859964)

(45)発行日　平成28年2月16日(2016.2.16)　(24)登録日　平成27年12月25日(2015.12.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 5/097	(2006.01)	C07K	5/097	ZNA
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	Z
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61P 35/02	(2006.01)	A61P	35/02	

請求項の数 16　(全 105 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2012-523678(P2012-523678)
(86)(22)出願日	平成22年8月2日(2010.8.2)
(65)公表番号	特表2013-501055(P2013-501055A)
(43)公表日	平成25年1月10日(2013.1.10)
(86)国際出願番号	PCT/US2010/044078
(87)国際公開番号	WO2011/017249
(87)国際公開日	平成23年2月10日(2011.2.10)
審査請求日	平成25年7月5日(2013.7.5)
(31)優先権主張番号	61/230,932
(32)優先日	平成21年8月3日(2009.8.3)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	61/232,883
(32)優先日	平成21年8月11日(2009.8.11)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　513169973
メダレックス・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
ＭＥＤＡＲＥＸ，　Ｌ．Ｌ．Ｃ．
アメリカ合衆国０８５４０ニュージャージー州プリンストン、ルート２０６アンド・プロビンス・ライン・ロード
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100100158
弁理士　鮫島　睦
(74)代理人　100126778
弁理士　品川　永敏
(74)代理人　100150500
弁理士　森本　靖

最終頁に続く

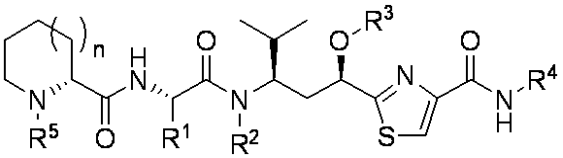
(54)【発明の名称】抗増殖性化合物、その抱合体、そのための方法ならびにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

式（ＩＩ）

【化１】



(II)

［式中、

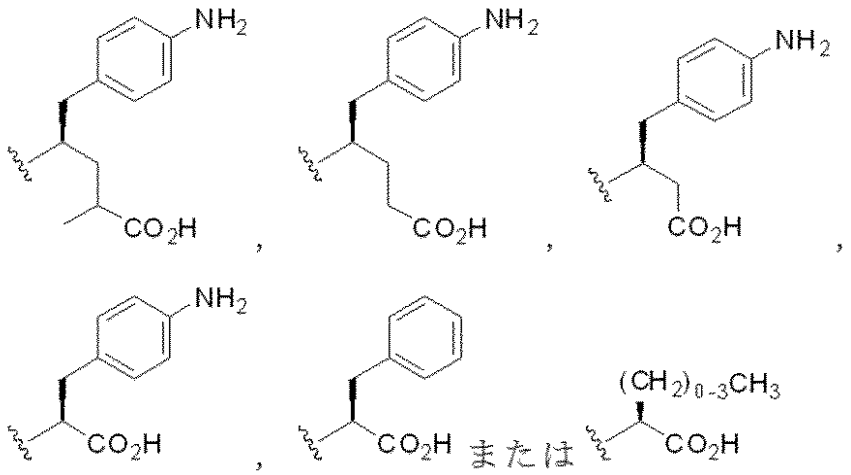
ｎは、０、１または２であり；

Ｒ[1]、Ｒ[2]およびＲ[3]は、独立して、Ｈ、無置換または置換Ｃ[1]－Ｃ[10]アルキル、無置換または置換Ｃ[2]－Ｃ[10]アルケニル、無置換または置換Ｃ[2]－Ｃ[10]アルキニル、無置換または置換アリール、無置換または置換ヘテロアリール、無置換または置換（ＣＨ[2]）[1－2]Ｏ（Ｃ[1]－Ｃ[10]アルキル）、無置換または置換（ＣＨ[2]）[1－2]Ｏ（Ｃ[2]－Ｃ[10]アルケニル）、無置換または置換（ＣＨ[2]）[1－2]Ｏ（Ｃ[2]－Ｃ[10]アルキニル）、（ＣＨ[2]）[1－2]ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ[1]－Ｃ[10]アルキル）、無置換または置換（ＣＨ[2]）[1－2]ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ[2]－Ｃ[10]アルケニル）、無置換または置換（ＣＨ[2]）[1－2]ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ[2]－Ｃ[10]アルキニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ[1]－Ｃ[10]ア

ルキル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_2$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_2$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、無置換または置換シクロ脂肪族、無置換または置換ヘテロシクロ脂肪族、無置換または置換アリールアルキル、あるいは無置換または置換アルキルアリールであり；

Ｒ^{4}は、

【化２】



であり；ならびに

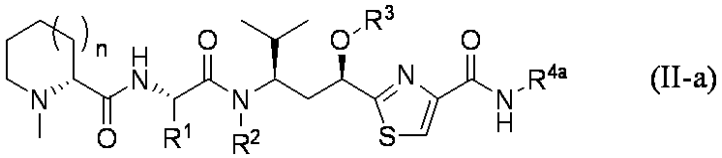
Ｒ^{5}は、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル、Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルケニル、Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルキニル、ＣＯ（Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル）、ＣＯ（Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルケニル）またはＣＯ（Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルキニル）である］

によって表される構造を有する化合物またはその医薬的に許容されるエステル、Ｒ^{4}のカルボキシル基でα－アミノ酸のα－アミノ基と結合したその医薬的に許容されるアミド、あるいはその医薬的に許容される塩。

【請求項２】

式（ＩＩ－ａ）

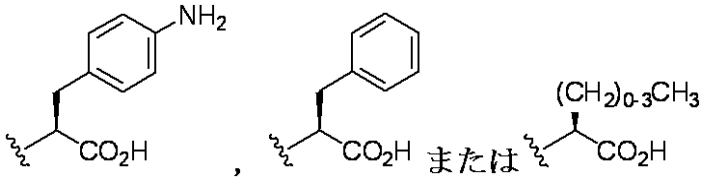
【化３】



［式中、

Ｒ^{4a}は、

【化４】



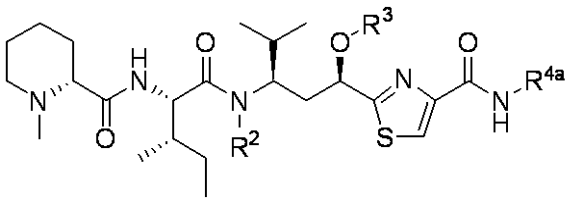
である］

によって表される構造を有する、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】

式（ＩＩ－ａ’）：

【化５】

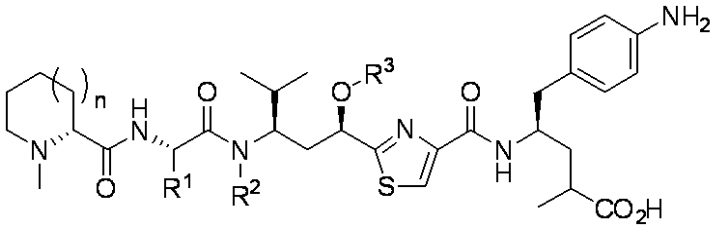


(II-a')

［式中、
Ｒ^{2}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）またはＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）であり；ならびに
Ｒ^{3}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、Ｃ（＝Ｏ）Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキルまたはＣ（＝Ｏ）Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニルである］
によって表される構造を有する、請求項２に記載の化合物。

【請求項４】
式（ＩＩ－ｂ）：

【化６】

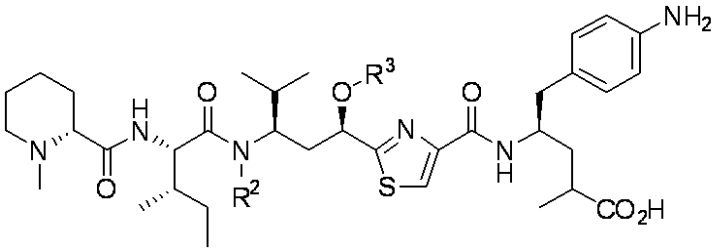


(II-b)

によって表される構造を有する、請求項１に記載の化合物。

【請求項５】
式（ＩＩ－ｂ’）：

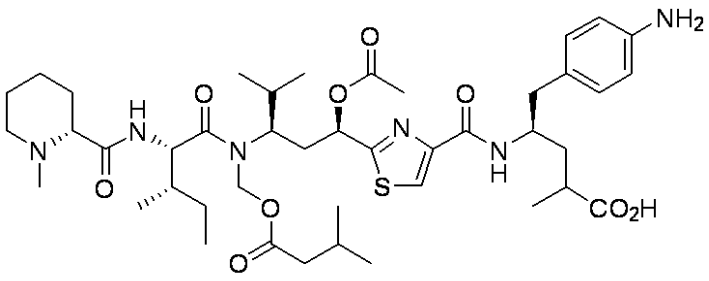
【化７】



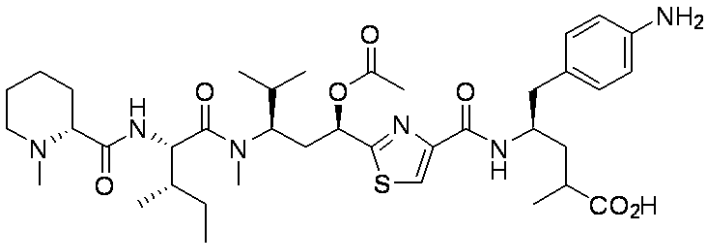
(II-b')

［式中、
Ｒ^{2}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）またはＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）であり；ならびに
Ｒ^{3}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、Ｃ（＝Ｏ）Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキルまたはＣ（＝Ｏ）Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニルである］
によって表される構造を有する、請求項４に記載の化合物。

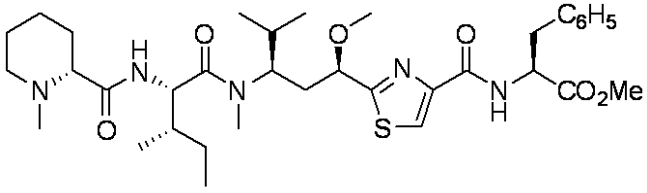
【請求項６】
式：



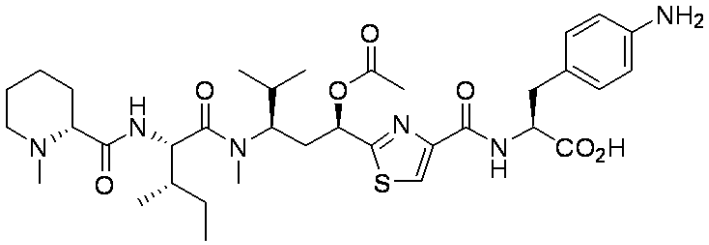
（ＩＩＩ－ａ），



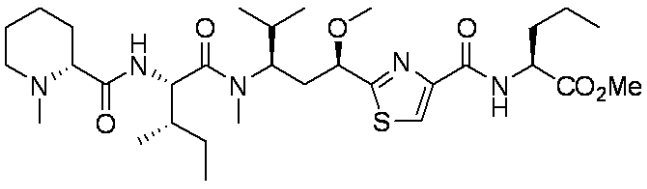
（ＩＩＩ－ｂ），



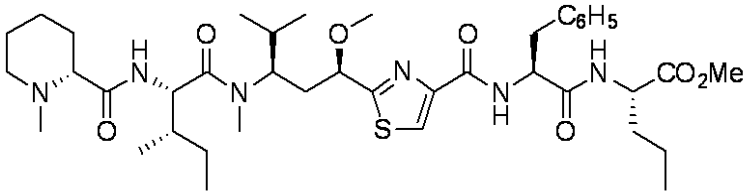
（ＩＩＩ－ｃ），



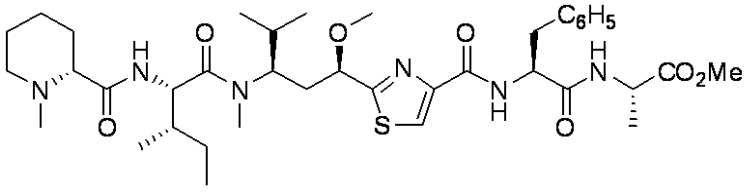
（ＩＩＩ－ｄ），



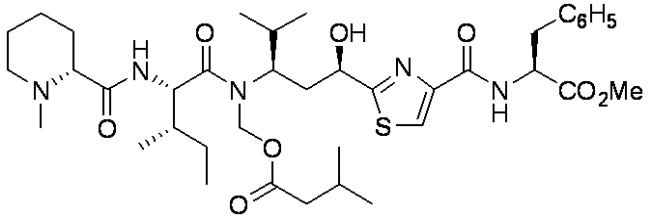
（ＩＩＩ－ｅ），



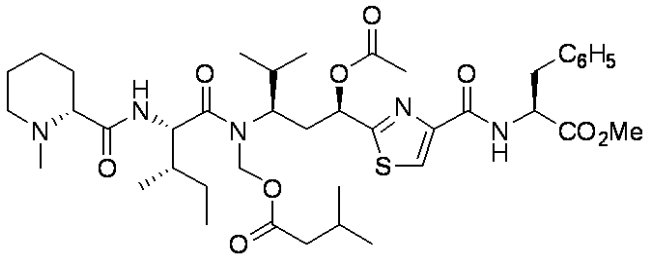
（ＩＩＩ－ｆ），



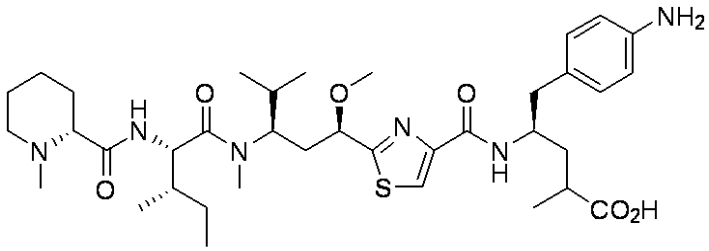
（ＩＩＩ－ｇ），



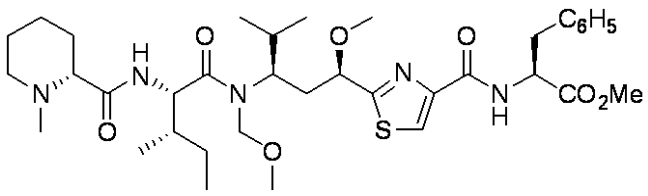
（ＩＩＩ－ｈ），



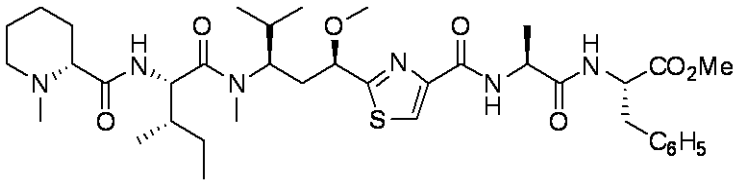
（ＩＩＩ－ｉ），



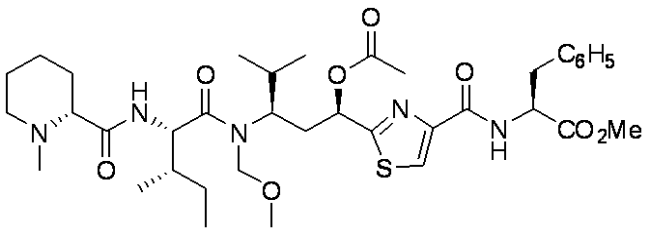
（ＩＩＩ－ｊ），



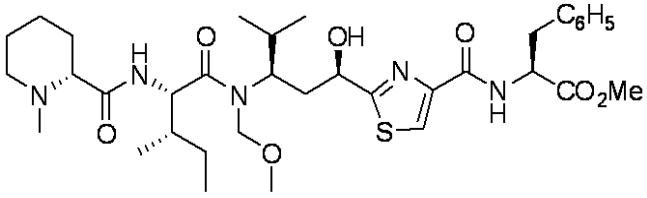
（ＩＩＩ－ｋ），



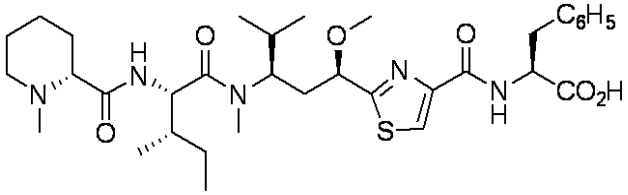
(ＩＩＩ－ｌ)，



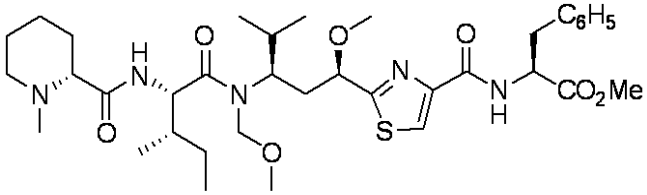
(ＩＩＩ－ｍ)，



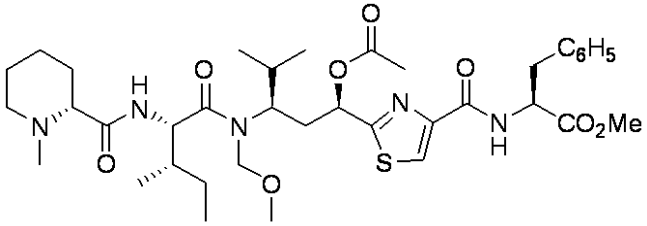
(ＩＩＩ－ｎ)，



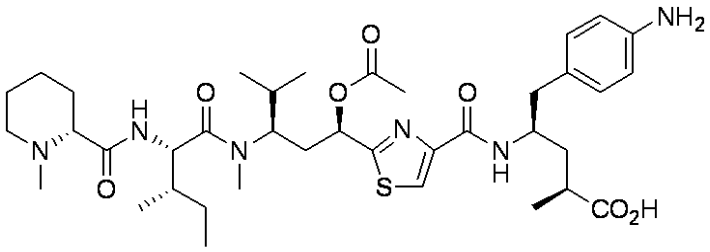
(ＩＩＩ－ｏ)，



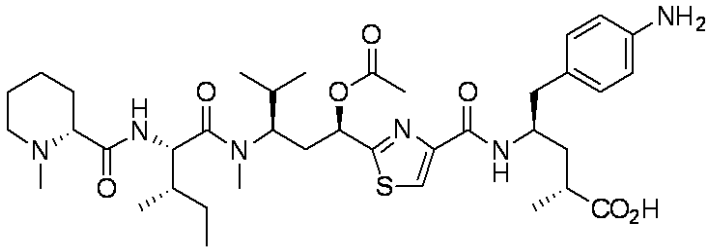
(ＩＩＩ－ｐ)，



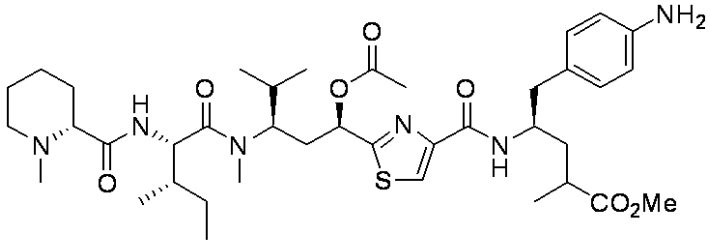
(ＩＩＩ－ｑ)，



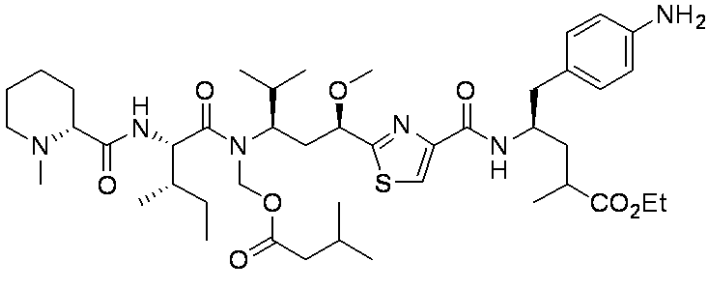
(ＩＩＩ－ｒ),



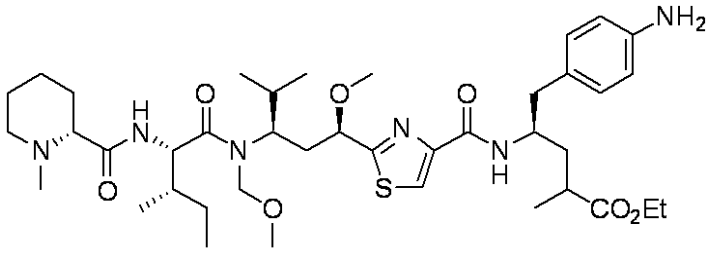
(ＩＩＩ－ｓ),



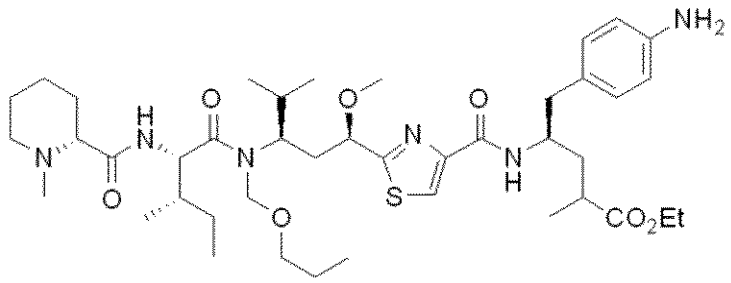
(ＩＩＩ－ｔ),



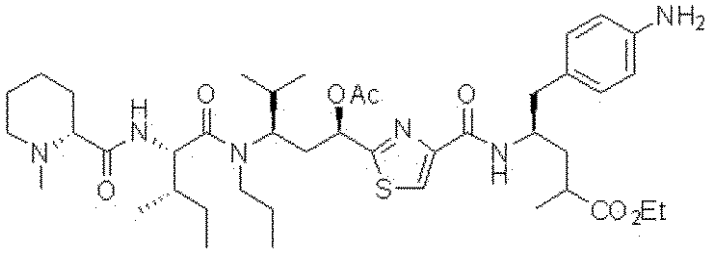
(ＩＩＩ－ｕ),



(ＩＩＩ－ｖ),



（ＩＩＩ－ｗ）または



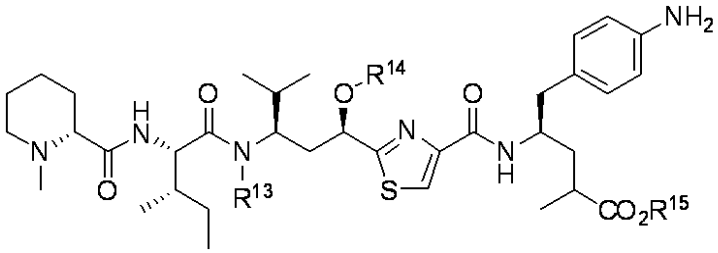
（ＩＩＩ－ｙ）

によって表される構造を有する、請求項１に記載の化合物。

【請求項７】

式（ＩＩ－ｃ）

【化８】



(II-c)

［式中、

R^{13}は、Ｍｅ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMeまたは$CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$であり；R^{14}は、ＭｅまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅであり；ならびにR^{15}は、ＨまたはC_1－C_5アルキルである］

によって表される構造を有する、請求項１に記載の化合物。

【請求項８】

抗体に抱合されている請求項１に記載の化合物を含む、抱合体。

【請求項９】

式（ＩＶ）：

$$[D(X^D)_aC(X^Z)_b]_mZ \qquad (IV)$$

［式中、

Ｄは、請求項１に記載の化合物であり；

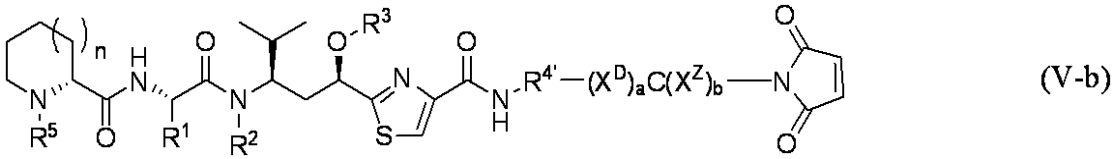
Ｚは、抗体であり；

X^DおよびX^Zは、スペーサー基であり；

Ｃは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ、Ｃｉｔ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｃｉｔ、ＳｅｒおよびＧｌｕからなる群から選択される１から５個のアミノ酸からなる配列からなるものであって、Ｃｉｔは、シトルリンを示すものであり；

ａおよびｂの各々は、独立して、０または１であり；ならびに

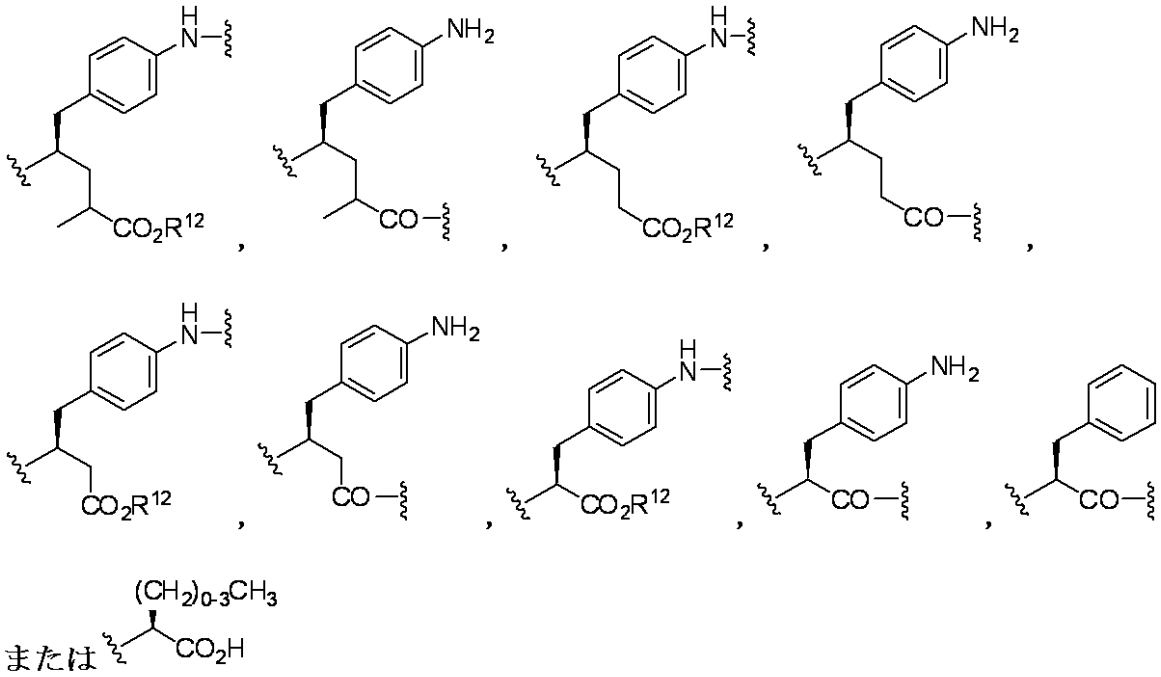
ｍは、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０である］
によって表される構造を有する抱合体。
【請求項１０】
式（Ｖ－ａ）
Ｄ－（Ｘ^{D}）$_{a}$Ｃ（Ｘ^{Z}）$_{b}$－Ｒ^{31}　　（Ｖ－ａ）
［式中、
Ｒ^{31}は、抗体における官能基との反応に適した官能基であり；
Ｄは、請求項１に記載の化合物であり；
Ｘ^{D}およびＸ^{Z}は、スペーサー基であり；
Ｃは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ、Ｃｉｔ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｃｉｔ、ＳｅｒおよびＧｌｕからなる群から選択される１から５個のアミノ酸からなる配列からなるものであって、Ｃｉｔは、シトルリンを示すものであり；ならびに
ａおよびｂの各々は、独立して０または１である］
によって表される構造を有する化合物を含む、抗体との抱合体を製造するための組成物。
【請求項１１】
式（Ｖ－ｂ）
【化９】



(V-b)

［式中、
ｎは、０、１または２であり；
Ｒ^{1}、Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、独立して、Ｈ、無置換または置換Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル、無置換または置換Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル、無置換または置換Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル、無置換または置換アリール、無置換または置換ヘテロアリール、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$Ｏ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、無置換または置換シクロ脂肪族、無置換または置換ヘテロシクロ脂肪族、無置換または置換アリールアルキル、あるいは無置換または置換アルキルアリールであり；
Ｒ$^{4'}$は、

【化１０】



であって、

Ｒ^{12}は、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル、Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルケニルまたはＣ$_2$－Ｃ$_5$アルキニルであり；ならびに

Ｒ^{5}は、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル、Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルケニル、Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルキニル、ＣＯ（Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル）、ＣＯ（Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルケニル）またはＣＯ（Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルキニル）であり；

Ｘ^{D}およびＸ^{Z}は、スペーサー基であり；

Ｃは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ、Ｃｉｔ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｃｉｔ、ＳｅｒおよびＧｌｕからなる群から選択される１から５個のアミノ酸からなる配列からなるものであって、Ｃｉｔは、シトルリンを示すものであり；ならびに

ａおよびｂは、独立して、０または１であって；

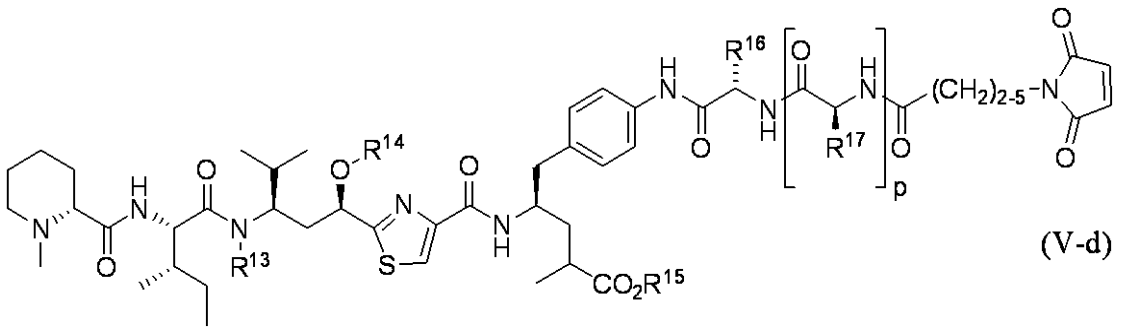
基Ｒ$^{4'}$は、ａが１である場合に基Ｘ^{D}またはａが０である場合に基Ｃのいずれかに、そのカルボキシルまたはアミン基を介して結合している］

によって表される構造を有する化合物を含む、抗体との抱合体を製造するための組成物。

【請求項１２】

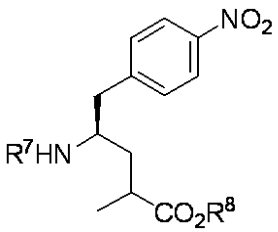
式（Ｖ－ｄ）：

【化１１】



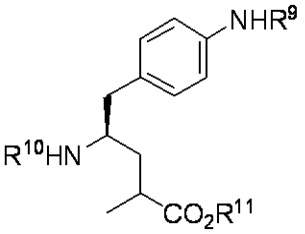
(V-d)

［式中、
R^{13}は、Ｍｅ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMeまたはCH_2OH（＝Ｏ）$CH_2CH(Me)_2$であり、R^{14}は、ＭｅまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅであり；ならびにR^{15}は、ＨまたはC_1－C_5アルキルであり；R^{16}は、$(CH_2)_4NH_2$または$(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$であり；R^{17}は、$C(Me)_2$またはＭｅであり；ならびにｐは、０または１である］
によって表される構造を有する化合物を含む、抗体との抱合体を製造するための組成物。
【請求項１３】
請求項１に記載の化合物または請求項８に記載の抱合体を含む、癌の治療剤。
【請求項１４】
式（ＶＩＩＩ－ａ）
【化１２】



(VIII-a)

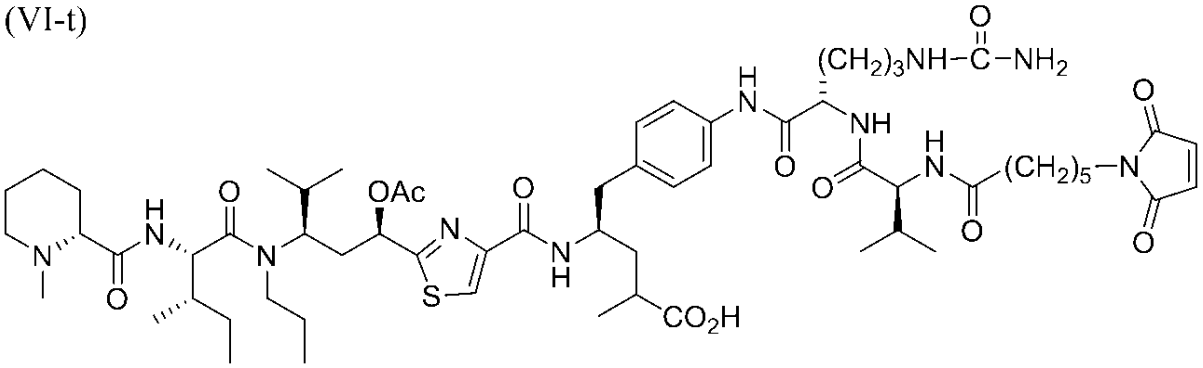
［式中、
R^7は、Ｈまたはアミン保護基であり、R^8は、Ｈ、C_1－C_{10}アルキル、C_2－C_{10}アルケニル、C_2－C_{10}アルキニル、アリール、シクロ脂肪族、アルキルシクロ脂肪族、アリールアルキルまたはアルキルアリールである］
によって表される構造を有する化合物。
【請求項１５】
式（ＶＩＩＩ－ｂ）
【化１３】



(VIII-b)

［式中、
R^9およびR^{10}は、独立して、Ｈまたはアミン保護基であり、R^{11}は、Ｈ、C_1－C_{10}アルキル、C_2－C_{10}アルケニル、C_2－C_{10}アルキニル、アリール、シクロ脂肪族、アルキルシクロ脂肪族、アリールアルキルまたはアルキルアリールである］
によって表される構造を有する化合物。
【請求項１６】
式：

(VI-t)



によって表される構造を有する化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ツブリシンに構造的に関連している化合物、リガンドを有するその抱合体、このような化合物および抱合体を製造および使用するための方法、ならびにこのような化合物および抱合体を含む組成物に関する。

【背景技術】

【０００２】

ツブリシンは、元々、粘液細菌Ａｒｃｈａｎｇｉｕｍ　ｇｅｐｈｙｒａまたはＡｎｇｉｏｃｏｃｃｕｓ　ｄｉｓｃｉｆｏｒｍｉｓの培養物から単離された細胞毒素であり、その際、各生物はツブリシンの異なる混合物を産生する（非特許文献１；特許文献１）。その結晶構造および生合成経路は明らかにされており（非特許文献２）、その生合成遺伝子は塩基配列が決定されている（特許文献２）。ツブリシンの生合成前駆体であるプレツブリシンもまた、それ自体が顕著な活性を有することが示されている（非特許文献３）。（第１著者または発明者および年によって本明細書に引用されている文献についての完全な引用は、本明細書の最後に列挙されている。）

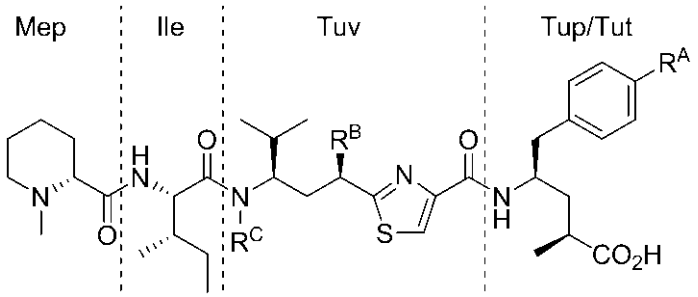
【０００３】

ツブリシンは、ホモプシン、ドラスタチンおよびクリプトフィシンを包含する天然に存在する抗有糸分裂性ポリペプチドおよびデプシペプチドの一群に属する（非特許文献４）。ポリペプチドまたはデプシペプチド以外の抗有糸分裂薬、例えば、パクリタキセル、メイタンシンおよびエポチロンも存在する。有糸分裂の間、細胞の微小管が再構築して紡錘体を形成するが、その際、プロセスは、微小管成分タンパク質α－およびβ－チューブリンの迅速な組立および分解を必要とする。分子レベルでは、正確な阻害メカニズムは薬剤ごとに異なることもあるが、抗有糸分裂薬は、このプロセスを阻害し、細胞が有糸分裂することを妨げる。ツブリシンは、チューブリンの微小管への組み立てを妨げることによって、影響を受けた細胞をG_2／M相で蓄積させ、アポトーシスを引き起こす（非特許文献５）。逆に、パクリタキセルは、微小管に結合し、その分解を妨げることによって同じ最終結果をもたらす。

【０００４】

ツブリシンは、１個のタンパク新生アミノ酸サブユニットおよび３つの非タンパク新生アミノ酸サブユニット：Ｎ－メチルピペコリン酸（Ｍｅｐ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、ツブバリン（Ｔｕｖ）およびツブフェニルアラニン（Ｔｕｐ，R^Aは下記式（Ｉ）中のＨに等しい）またはツブチロシン（Ｔｕｔ，R^AはＯＨに等しい）から構成されるテトラペプチジル骨格を有する。約１２種の天然のツブリシン（Ａ、Ｂなどと名付けられている）が公知であり、それらの間の構造的な変化の部位は、式（Ｉ）および表１に示されるように残基R^A、R^BおよびR^Cである：

【化１】



【表１】

表１－天然に存在するツブリシン

ツブリシン	R^A	R^B	R^C
A	OH	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)i\text{-}Bu$
B	OH	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)n\text{-}Pr$
C	OH	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)Et$
D	H	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)i\text{-}Bu$
E	H	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)n\text{-}Pr$
F	H	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)Et$
G	OH	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)CH=CH_2$
H	H	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)Me$
I	OH	OC(=O)Me	$CH_2OC(=O)Me$
U	H	OC(=O)Me	H
V	H	OH	H
Z	OH	OH	H
プレツブリシン	H	H	Me

【０００５】

非特許文献６は、ツブリシンＡの抗増殖特性を研究し、パクリタキセルおよびビンブラスチンなどの他の抗有糸分裂薬よりも効力が高く、異種移植片アッセイにおいて、様々な癌細胞株に対して活性を有することを見出した。さらに、ツブリシンＡは、癌細胞ではアポトーシスを誘発したが、正常な細胞では誘発せず、インビトロアッセイでは極めて強力な抗血管形成特性を示した。他のツブリシンの抗有糸分裂特性もまた評価されており、一般に、非ツブリシン抗有糸分裂薬の抗有糸分裂特性と比較して有望であることが見出されている（例えば、非特許文献７～９を参照されたい）。これらの理由のため、ツブリシンは、抗癌薬として多大な関心が寄せられている（例えば、非特許文献１０および４を参照されたい）。

【０００６】

多数の公報が、ツブリシンの合成に関する試みを記載しており、非特許文献７および１１～１９が含まれる。他の公報は、ツブリシン類似体または誘導体の調製および評価を介して構造活性相関（ＳＡＲ）研究を記載している：非特許文献７、２０～２４および特許文献３～９。ＳＡＲ研究は、主に、Ｍｅｐ環、Ｔｕｖサブユニットの残基R^BおよびR^CならびにＴｕｐ／Ｔｕｔサブユニットの芳香環または脂肪族炭素鎖における構造変化を調査した。

【０００７】

Domling et al. 2005は、ポリマーまたは生体分子として一般に記載されるパートナー分子を有するツブリシンの抱合体を開示するが、実際の実施例では、パートナー分子としてのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）に限られている。ツブリシンの抱合体を開示している他の文献は、特許文献１０～１７および非特許文献２５および２６である。特許文献１２は、薬物（ツブリシンを包含）に抱合してそれらの生物活性および水溶解性を向上させることができるポリ陰イオン性ポリペプチドを開示する。

【０００８】
特許文献１８および非特許文献２７は、ツブリシンがＴｕｐ／Ｔｕｔカルボキシル基に結合しているヒドラジドージスルフィドリンカー部分を介してシクロデキストリンに共有結合しているシクロデキストリンに基づいた製剤を開示する。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００９】
【特許文献１】Ｒｅｉｃｈｅｎｂａｃｈら，ＷＯ９８／１３３７５　Ａ１（１９９８）
【特許文献２】Ｈｏｅｆｌｅら，ＵＳ２００６／０２１７３６０　Ａ１（２００６）
【特許文献３】Ｄｏｍｌｉｎｇら，ＵＳ２００５／０２３９７１３　Ａ１（２００５）
【特許文献４】Ｅｌｌｍａｎら，ＷＯ２００９／０１２９５８　Ａ２（２００９）
【特許文献５】Ｈｏｅｆｌｅら，ＤＥ１００　０８　０８９　Ａ１（２００１）
【特許文献６】Ｈｏｅｆｌｅら，ＵＳ２００６／０１２８７５４　Ａ１（２００６）
【特許文献７】Ｒｉｃｈｔｅｒ，ＷＯ２００８／１３８５６１　Ａ１（２００８）
【特許文献８】Ｖｌａｈｏｖら，ＷＯ２００９／０５５５６２　Ａ１（２００９）
【特許文献９】Ｗｉｐｆら，ＵＳ２０１０／００４７８４１　Ａ１（２０１０）
【特許文献１０】Ｂｏｙｄら，ＵＳ２００８／０２７９８６８　Ａ１（２００８）
【特許文献１１】Ｂｏｙｄら，ＵＳ７，６９１，９６２　Ｂ２（２０１０）
【特許文献１２】Ｖｌａｈｏｖら，ＵＳ２００８／０２４８０５２　Ａ１（２００８）
【特許文献１３】Ｖｌａｈｏｖら，ＵＳ２００８／０２４８０５２　Ａ１（２００８）
【特許文献１４】Ｖｌａｈｏｖら，ＵＳ２０１０／００４８４９０　Ａ１（２０１０）
【特許文献１５】Ｌｅａｍｏｎら，ＷＯ２００９／００２９９３　Ａ１（２００９）
【特許文献１６】Ｌｏｗら，ＷＯ２００９／０２６１７７　Ａ１（２００９）
【特許文献１７】Ｌｅｕｎｇら，ＵＳ２００２／０１６９１２５　Ａ１（２００２）
【特許文献１８】Ｄａｖｉｓら，ＵＳ２００８／０１７６９５８　Ａ１（２００８）
【非特許文献】
【００１０】
【非特許文献１】Sasse et al., J. Antibiotics 2000, 53 (9), 879-885.
【非特許文献２】Steinmetz et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 4888-4892.
【非特許文献３】Ullrich et al., Angew. Chemie Int. Ed. 2009, 48, 4422-4425.
【非特許文献４】Hamel et al., Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents 2002, 2, 19-53.
【非特許文献５】Khalil et al., ChemBioChem 2006, 7, 678-683.
【非特許文献６】Kaur et al., Biochem. J. 2006, 396, 235-242.
【非特許文献７】Balasubramanian et al., J. Med. Chem. 2009, 52 (2), 238-240.
【非特許文献８】Steinmetz et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 4888-4892.
【非特許文献９】Wipf et al., Org. Lett. 2004, 6 (22), 4057-4060.
【非特許文献１０】Domling et al., Mol. Diversity 2005, 9, 141-147.
【非特許文献１１】Domling et al., Ang. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 7235-7239.
【非特許文献１２】Hoefle et al., Pure Appl. Chem. 2003, 75 (2-3), 167-178.
【非特許文献１３】Neri et al., ChemMedChem 2006, 1, 175-180.
【非特許文献１４】Peltier et al., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 16018-16019.
【非特許文献１５】Sani et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3526-3529.
【非特許文献１６】Sasse et al., Nature Chem. Biol. 2007, 3 (2), 87-89.
【非特許文献１７】Shankar et al., SYNLETT 2009, 8, 1341-1345.
【非特許文献１８】Shibue et al., Tetrahedron Lett. 2009 50, 3845-3848.
【非特許文献１９】Wipf et al., Org. Lett. 2004, 6 (22), 4057-4060.
【非特許文献２０】Balasubramanian et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 2996-2999.
【非特許文献２１】Patterson et al., Chem. Eur. J. 2007, 13, 9534-9541.

【非特許文献２２】Patterson et al., J. Org. Chem. 2008, 73, 4362-4369.
【非特許文献２３】Wang et al., Chem. Biol. Drug. Des 2007, 70, 75-86.
【非特許文献２４】Wipf et al., Org. Lett. 2007, 9 (8), 1605-1607.
【非特許文献２５】Leamon et al., Cancer Res. 2008, 68 (23), 9839-9844.
【非特許文献２６】Reddy et al., Mol. Pharmaceutics 2009, 6 (5), 1518-1525.
【非特許文献２７】Schluep et al., Clin. Cancer Res. 2009, 15 (1), 181-189.

【発明の概要】

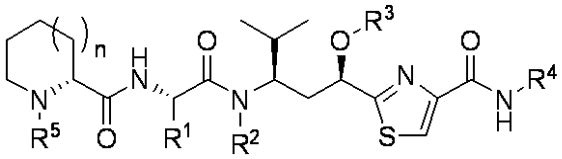
【００１１】

本発明は、ツブリシンに構造的に関連し、多くの癌細胞に対して細胞毒性または細胞増殖抑制性を有し、抗有糸分裂性機構によって作用すると考えられる新規な抗増殖性化合物を開示している。これらの化合物は、癌細胞に対して標的送達するための抗体などのリガンドに抱合させることができる。

【００１２】

ある態様において、本発明は、式（ＩＩ）

【化２】



(II)

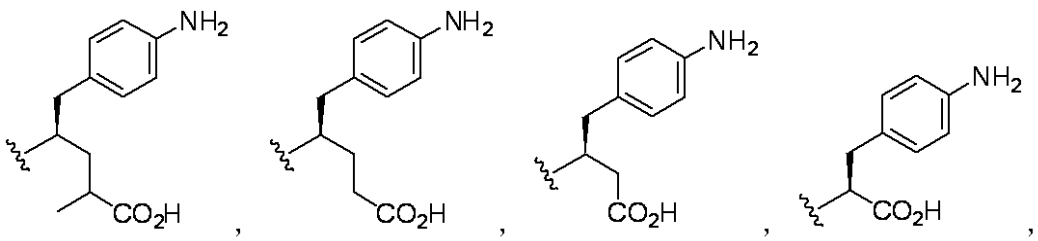
［式中、

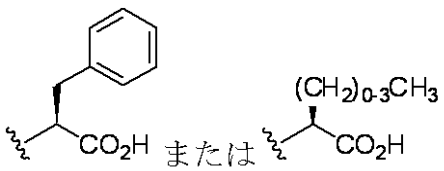
ｎは、０、１または２であり；

R^1、R^2およびR^3は、独立して、Ｈ、無置換または置換C_1－C_{10}アルキル、無置換または置換C_2－C_{10}アルケニル、無置換または置換C_2－C_{10}アルキニル、無置換または置換アリール、無置換または置換ヘテロアリール、無置換または置換$(CH_2)_{1-2}O$（C_1－C_{10}アルキル）、無置換または置換$(CH_2)_{1-2}O$（C_2－C_{10}アルケニル）、無置換または置換$(CH_2)_{1-2}O$（C_2－C_{10}アルキニル）、$(CH_2)_{1-2}OC$（＝Ｏ）（C_1－C_{10}アルキル）、無置換または置換$(CH_2)_{1-2}OC$（＝Ｏ）（C_2－C_{10}アルケニル）、無置換または置換$(CH_2)_{1-2}OC$（＝Ｏ）（C_2－C_{10}アルキニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（C_1－C_{10}アルキル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（C_2－C_{10}アルケニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（C_2－C_{10}アルキニル）、無置換または置換シクロ脂肪族、無置換または置換ヘテロシクロ脂肪族、無置換または置換アリールアルキル、あるいは無置換または置換アルキルアリールであり；

R^4は、

【化３】





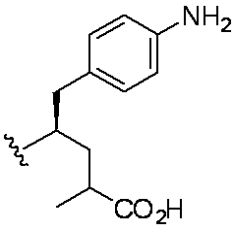
であり；ならびに

Ｒ^{5}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルキニル、ＣＯ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）、ＣＯ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）またはＣＯ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルキニル）である］
によって表される構造を有する化合物またはその医薬的に許容されるエステル、Ｒ^{4}のカルボキシル基でα－アミノ酸のα－アミノ基と結合したその医薬的に許容されるアミドまたはその医薬的に許容される塩を提供する。

【００１３】

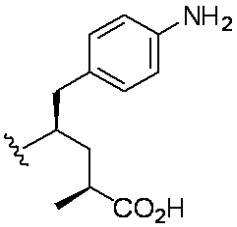
好ましいＲ^{4}は、カルボキシルに対してアルファに位置するメチル基の立体化学を有する

【化４】



であり、より好ましくは、天然のツブリシン、すなわち：

【化５】



に相当するものである。

【００１４】

本発明はまた、式（ＩＩ）に記載の化合物を合成するのに有用な新規の中間体を提供する。

【００１５】

別の態様において、本発明は、癌細胞などの標的細胞への選択的な送達のためのリガンド（好ましくは、抗体、より好ましくは、モノクローナル抗体、最も好ましくは、ヒトモノクローナル抗体）に対してリンカー部分を介して抱合された本発明の化合物を提供する。

【００１６】

別の態様において、リガンドに対する抱合に適した本発明の化合物およびリンカー部分を含む組成物が提供される。

【００１７】

別の態様において、本発明は、癌にかかっている対象における癌細胞の細胞増殖を阻害するための方法であって、治療上有効量の本発明の化合物またはリガンド（特に、抗体）を有するその抱合体をその対象に投与することを特徴とする方法を提供する。別の態様において、癌細胞の細胞増殖を阻害するための方法であって、かかる細胞を、かかる癌細胞の増殖を阻害するのに十分な条件下で、本発明の化合物またはリガンド（特に、抗体）を有するその抱合体と接触させることを特徴とする方法が提供される。癌細胞は、結腸直腸癌、肝臓癌、前立腺癌、乳房癌、メラノーマ、膠芽細胞腫、肺癌、膵臓癌、卵巣癌、多発性骨髄腫、腎臓癌、白血病またはリンパ腫細胞でありうる。リガンドが抗体である場合、癌細胞で発現される抗原に結合することが好ましい。

【００１８】

別の態様において、かかる癌にかかっている対象における癌の治療方法であって、治療上有効量の本化合物またはリガンド（特に、抗体）を有するその抱合体を対象に投与することを特徴とする方法が提供される。別の態様において、癌の治療剤の製造のための本化

合物（またはリガンド（特に、抗体）を有するその抱合体）の使用が提供される。これらの態様において、癌は、結腸直腸癌、肝臓癌、前立腺癌、乳房癌、メラノーマ、膠芽細胞腫、肺癌、膵臓癌、卵巣癌、多発性骨髄腫、腎臓癌、白血病またはリンパ腫でありうる。リガンドが抗体である場合、抗体が癌の細胞で発現される抗原に結合することが好ましい。

【００１９】

別の態様において、かかる癌にかかっている対象における癌の治療剤の製造のための本化合物またはリガンド（好ましくは、抗体）を有するその抱合体の使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】図１ａおよび１ｂは、合わせて本化合物を調製するためのスキーム１を示す。

【図２】図２は、本化合物を調製するためのスキーム２を示す。

【図３】図３は、本化合物を調製するためのスキーム３を示す。

【図４】図４は、ペプチジルリンカーおよびマレイミド反応基を本化合物に結合させるのに適したスキーム４を示す。

【図５】図５は、本化合物を調製するためのスキーム５を示す。

【図６】図６は、本化合物を調製するためのスキーム６を示す。

【図７】図７は、本化合物を調製するためのスキーム７を示す。

【図８】図８ａ、８ｂおよび８ｃは、本化合物を調製するために有用な中間体を調製するためのスキーム８、９および１０をそれぞれ示す。

【図９】図９は、図８ａ～８ｃに示されるような中間体が本化合物に変換されうる方法を図示するスキーム１１を示す。

【図１０】図１０は、図８ａ～８ｃに示されるような中間体が本化合物に変換されうる方法を図示するスキーム１２を示す。

【図１１】図１１ａおよび１１ｂは、２種類の異なるタイプの癌細胞に対する本化合物の第１の組における^{3}Ｈ　チミジン細胞増殖アッセイのプロットを示す。

【図１２】図１２ａおよび１２ｂは、２種類の異なるタイプの癌細胞に対する本化合物の第２の組におけるＡＴＰ発光増殖アッセイのプロットを示す。図１２ｃおよび１２ｄは、２種類の異なるタイプの癌細胞に対する本化合物の同じ第２の組における^{3}Ｈ　チミジン細胞増殖アッセイのプロットを示す。

【図１３】図１３は、^{3}Ｈ　チミジン細胞増殖アッセイにおける本化合物の抱合体の腎臓癌細胞に対する活性を示す。

【図１４】図１４は、異種移植実験における本化合物の抱合体の腎臓癌細胞に対する活性を示す。

【図１５】図１５は、本化合物を調製するのに有用な中間体を調製するためのスキーム１３を示す。

【図１６】図１６は、スキーム１３により調製された中間体から本化合物を調製するためのスキーム１４を示す。

【図１７】図１７は、本発明の抱合準備（conjugation-ready）化合物を調製するためのスキーム１５を示す。

【図１８】図１８は、本発明の抱合準備化合物を調製するためのスキーム１６を示す。

【図１９】図１９は、本化合物を調製するのに有用な中間体を調製するためのスキーム１７を示す。

【図２０】図２０ａおよび２０ｂは、合わせて、スキーム１７の中間体から本化合物の調製のためのスキーム１８を示す。

【図２１】図２１は、スキーム１８に用いられる中間体を調製するためのスキーム１９を示す。

【図２２】図２２は、本化合物の調製に用いられる中間体の合成のためのスキーム２０を示す。

【図２３】図２３は、スキーム２０の中間体から本化合物を調製するためのスキーム２１

を示す。
【図２４】図２４は、本化合物を調製するのに有用なさらなる別の中間体を調製するためのスキーム２２を示す。
【図２５】図２５は、スキーム２２の中間体から本化合物を調製するためのスキーム２３を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
「抗体」は、抗体全体および任意の抗原結合フラグメント（すなわち「抗原結合部分」）またはその単一鎖を意味する。抗体全体は、ジスルフィド結合によって中間接続されている少なくとも２つの重（Ｈ）鎖および２つの軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質である。重鎖はそれぞれ、重鎖可変領域（V_H）と、３つのドメイン、すなわちC_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}を含む重鎖定常領域とを含む。軽鎖はそれぞれ、軽鎖可変領域（V_LまたはV_k）と、単一のドメイン、すなわちC_Lを含む軽鎖定常領域とを含む。V_HおよびV_L領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性と、その間に存在するより保存性の高いフレームワーク領域（ＦＲ）とにさらに細分することができる。V_HおよびV_Lはそれぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端へと下記の順序、すなわちＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４で配置されている３つのＣＤＲおよび４つのＦＲを含む。可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。定常領域は、抗体と、免疫系（例えば、エフェクター細胞）の様々な細胞および古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）を包含する宿主組織または因子との結合を介在することができる。抗体が抗原Ｘに対して、５×１０^{-8}Ｍ以下、より好ましくは１×１０^{-8}Ｍ以下、より好ましくは６×１０^{-9}Ｍ以下、より好ましくは３×１０^{-9}Ｍ以下、なおより好ましくは２×１０^{-9}Ｍ以下のK_Dで結合する場合に、その抗体は、抗原Ｘに「特異的に結合」すると言われる。抗体は、キメラであるか、ヒト化されているか、あるいは、好ましくはヒトであってよい。重鎖定常領域は、糖鎖形成タイプまたは程度に影響を及ぼすか、抗体半減期を延長するか、エフェクター細胞または補体系との相互作用を高めるかまたは減らすか、またはある他の特性を調節するように操作されうる。この操作は、１つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、付加もしくは欠失によって、またはあるドメインを、他の免疫グロブリンタイプからのドメインと置き換えることによって、または前記の組合せによって達成することができる。
【００２２】
抗体の「抗体フラグメント」および「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）は、抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体の１つまたはそれ以上のフラグメントを意味する。抗体の抗原結合機能は、全長抗体のフラグメント、例えば、（ｉ）Ｆａｂフラグメント、すなわち、V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインからなる一価フラグメント；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、すなわち、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合されている２つのＦａｂフラグメントを含む二価フラグメント；（ｉｉｉ）主にＦａｂとヒンジ領域の一部とであるＦａｂ’フラグメント（例えば、Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6th Ed., Saunders Elsevier 2007を参照されたい）；（ｉｖ）V_HおよびC_{H1}ドメインからなるＦｄフラグメント；（ｖ）抗体の単一アームのV_LおよびV_HドメインからなるＦｖフラグメント、（ｖｉ）V_HドメインからなるｄＡｂフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）；（ｖｉｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）；ならびに（ｖｉｉｉ）ナノボディ、すなわち、単一の可変領域および２つの定常領域を含有する重鎖可変領域などによって行うことができることが示されている。さらに、Ｆｖフラグメントの２つのドメイン、すなわちV_LおよびV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、V_LおよびV_H領域が対になって一価分子を形成する単一タンパク質鎖（単一鎖ＦｖまたはｓｃＦｖとして公知）としてそれらを調製できる合成リンカーによって組換え方法を使用してこれらを結合させることができる；例えば、Bird et al.(1988) Science 242：423-426；およびHuston et al.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい。そのような単一鎖抗体はまた、抗体の「

抗原結合部分」という用語のうちに包含される。

【００２３】

「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味する（例えば、抗原Ｘに特異的に結合する単離された抗体は、抗原Ｘ以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、抗原Ｘに特異的に結合する単離された抗体は、他の種からの抗原Ｘ分子などの他の抗原に対する交差反応性を有することもある。ある実施形態では、単離された抗体は、ヒト抗原Ｘに特異的に結合し、他の（非ヒト）抗原Ｘ抗原とは交差反応しない。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学薬品を実質的に含み得ない。

【００２４】

「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一の結合特異性および特定のエピトープに対する親和性を示す単一の分子組成の抗体分子の製剤を意味する。

【００２５】

「ヒト抗体」は、フレームワークおよびＣＤＲ領域の両方（および存在する場合には定常領域）がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を意味する。ヒト抗体は、天然または合成修飾を包含する後の修飾を包含していてもよい。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基を包含していてもよい（例えば、インビトロでランダムまたは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボで体細胞突然変異によって導入される突然変異）。しかしながら、「ヒト抗体」には、マウスなどの他の哺乳動物種の生殖系に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列上に移行されている抗体は含まれない。

【００２６】

「ヒトモノクローナル抗体」は、フレームワークおよびＣＤＲ領域の両方がヒト生殖系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を意味する。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合しているヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られるＢ細胞を包含するハイブリドーマによって製造される。

【００２７】

「脂肪族」は、規定された数の炭素原子（例えば、「$Ｃ_{3}$脂肪族」、「$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{5}$脂肪族」または「$Ｃ_{1}$から$Ｃ_{5}$脂肪族」のようであり、ここで、後者２つの用語は、１から５個の炭素原子を有する脂肪族部分に関する同意語である）を有するか、または炭素原子の数が明確に規定されていない場合、１から４個の炭素原子（不飽和脂肪族部分の例では２から４個の炭素）を有する直鎖または分岐鎖、飽和または不飽和、非芳香族の炭化水素部分を意味する。

【００２８】

「アルキル」は、飽和脂肪族部分を意味し、その際、炭素原子数の表記に関しては同じ規定を適用することができる。一例として、$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{4}$アルキル部分には、これらに限られないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、ｔ－ブチル、１－ブチル、２－ブチルなどが包含される。

【００２９】

「アルケニル」は、少なくとも１個の炭素－炭素二重結合を有する脂肪族部分を意味し、その際、炭素原子数の表記に関しては同じ規定を適用することができる。一例として、$Ｃ_{2}$～$Ｃ_{4}$アルケニル部分には、これらに限られないが、エテニル（ビニル）、２－プロペニル（アリルまたはプロパ－２－エニル）、ｃｉｓ－１－プロペニル、トランス－１－プロペニル、Ｅ－（またはＺ－）２－ブテニル、３－ブテニル、１，３－ブタジエニル（ブタ－１，３－ジエニル）などが包含される。

【００３０】

「アルキニル」は、少なくとも１個の炭素－炭素三重結合を有する脂肪族部分を意味し

、その際、炭素原子数の表記に関しては同じ規定を適用することができる。一例として、C_2～C_4アルキニル基には、エチニル（アセチルエニル）、プロパルギル（プロパ－２－イニル）、１－プロピニル、ブタ－２－イニルなどが包含される。

【００３１】

「脂環式」は、１から３個の環を有し、それぞれの環が３から８個（好ましくは３から６個の）炭素原子を有する飽和または不飽和、非芳香族の炭化水素部分を意味する。「シクロアルキル」は、各環が飽和である脂環式部分を意味する。「シクロアルケニル」は、少なくとも１個の環が少なくとも１個の炭素－炭素二重結合を有する脂環式部分を意味する。「シクロアルキニル」は、少なくとも１個の環が少なくとも１個の炭素－炭素三重結合を有する脂環式部分を意味する。実例として、脂環式部分には、これらに限られないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、シクロオクチルおよびアダマンチルが包含される。好ましい脂環式部分は、シクロアルキルのもの、特にシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルである。

【００３２】

「ヘテロ脂環式」は、少なくとも１個のその環において、３個まで（好ましくは１から２個）の炭素がＮ、ＯまたはＳから独立して選択されるヘテロ原子で置き換えられていて、前記ＮおよびＳが所望により、酸化されていてよく、かつ前記Ｎが所望により、四級化されていてよい脂環式部分を意味する。同様に「ヘテロシクロアルキル」、「ヘテロシクロアルケニル」および「ヘテロシクロアルキニル」は、それぞれ少なくとも１個のその環において、そのように修飾されているシクロアルキル、シクロアルケニルまたはシクロアルキニル部分を意味する。例示的なヘテロ脂環式部分には、アジリジニル、アゼチジニル、１，３－ジオキサニル、オキセタニル、テトラヒドロフリル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチオピラニルスルホン、モルホリニル、チオモルホリニル、チオモルホリニルスルホキシド、チオモルホリニルスルホン、１，３－ジオキソラニル、テトラヒドロ－１，１－ジオキソチエニル、１，４－ジオキサニル、チエタニルなどが包含される。

【００３３】

「アルコキシ」、「アリールオキシ」、「アルキルチオ」および「アリールチオ」は、それぞれ－Ｏ（アルキル）、－Ｏ（アリール）、－Ｓ（アルキル）および－Ｓ（アリール）を意味する。例としてはそれぞれ、メトキシ、フェノキシ、メチルチオおよびフェニルチオである。

【００３４】

「ハロゲン」または「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味する。

【００３５】

「アリール」は、環がそれぞれ３から７個の炭素原子を有し、かつ少なくとも１個の環が芳香族である単環式、二環式または三環式環系を有する炭化水素部分を意味する。環系中の環は、相互に縮合しているか（ナフチルにおいてのように）、または相互に結合していてもよく（ビフェニルにおいてのように）、かつ非芳香環に縮合または結合していてもよい（インダニルまたはシクロヘキシルフェニルにおいてのように）。さらなる実例では、アリール部分には、これらに限定されないが、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、ビフェニル、フェナントリル、アントラセニルおよびアセナフチルが包含される。

【００３６】

「ヘテロアリール」は、環がそれぞれ３から７個の炭素原子を有し、かつ少なくとも１個の環が、Ｎ、ＯまたはＳから独立して選択される１から４個のヘテロ原子を含有する芳香環であり、前記ＮおよびＳが所望により、酸化されていてもよく、ならびに前記Ｎが、所望により、四級化されていてもよい、単環式、二環式または三環式環系を有する炭化水素部分を意味する。そのような少なくとも１個のヘテロ原子を含有する芳香環は、他のタイプの環に縮合していてよいか（ベンゾフラニルまたはテトラヒドロイソキノリルにおい

てのように）、または他の種類の環に直接結合していてもよい（フェニルピリジルまたは２－シクロペンチルピリジルにおいてのように）。さらなる一例では、ヘテロアリール部分には、ピロリル、フラニル、チオフェニル（チエニル）、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、Ｎ－オキソピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、シノリニル、キノザリニル、ナフチリジニル、ベンゾフラニル、インドリル、ベンゾチオフェニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フェノチアゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、ジベンゾチオフェニル、アクリジニルなどが包含される。

【００３７】

「置換または非置換Ｃ$_1$～Ｃ$_5$アルキル」または「所望により置換されているヘテロアリール」においてのように、「置換または非置換」または「所望により置換」という語句を使用することによって、ある部分が、置換されていてもよいと示されている場合、そのような部分は、好ましくは１から５個の数、より好ましくは１から２個の数の１つまたはそれ以上の独立して選択される置換基を有していてもよい。置換基および置換パターンは、当業者であれば選択することができるが、その際、置換基が結合した部分が、化学的に安定であり、当分野で公知の技術、さらには本明細書に記載の方法によって合成することができる化合物が提供される。

【００３８】

「アリールアルキル」、「（ヘテロシクロ脂肪族）アルキル」、「アリールアルケニル」、「アリールアルキニル」、「ビアリールアルキル」などは、場合によっては、アリール、ヘテロシクロ脂肪族、ビアリールなどの部分で置換され、場合によっては、アルキル、アルケニルまたはアルキニル部分の開環（不飽和）価、例えば、ベンジル、フェネチル、Ｎ－イミダゾイルエチル、Ｎ－モルホリノエチルなどで置換されたアルキル、アルケニルまたはアルキニル部分を意味する。反対に、「アルキルアリール」、「アルケニルシクロアルキル」などは、場合によっては、アルキル、アルケニルなどの部分で置換され、場合によっては、例えば、メチルフェニル（トリル）またはアリルシクロヘキシルなどで置換されたアリール、シクロアルキルなどの部分を意味する。「ヒドロキシアルキル」、「ハロアルキル」、「アルキルアリール」、「シアノアリール」などは、場合によっては、１つまたはそれ以上の特定の置換基（場合によっては、ヒドロキシル、ハロなど）で置換されたアルキル、アリールなどの部分を意味する。

【００３９】

例示として、許容可能な置換基には、以下に限定されないが、アルキル（特に、メチルまたはエチル）、アルケニル（特に、アリル）、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロ脂肪族、ヘテロシクロ脂肪族、ハロ（特に、フルオロ）、ハロアルキル（特に、トリフルオロメチル）、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル（特に、ヒドロキシエチル）、シアノ、ニトロ、アルコキシ、－Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｏ（ハロアルキル）（特に、－ＯＣＦ$_3$）、－Ｏ（シクロアルキル）、－Ｏ（ヘテロシクロアルキル）、－Ｏ（アリール）、アルキルチオ、アリールチオ、＝Ｏ、＝ＮＨ、＝Ｎ（アルキル）、＝ＮＯＨ、＝ＮＯ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｈ、－ＣＯ$_2$Ｈ、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＯＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、アジド、－ＮＨ$_2$、－ＮＨ（アルキル）、－Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨ（アリール）、－ＮＨ（ヒドロキシアルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｈ、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$、－ＯＳＯ$_2$（アルキル）、－ＳＨ、－Ｓ（アルキル）、－Ｓ（アリール）、－Ｓ（シクロアルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）アルキル、－ＳＯ$_2$（アルキル）、－

SO_2NH_2、－SO_2NH（アルキル）、－SO_2N（アルキル）$_2$などが含まれる。

【００４０】

置換される部分が脂肪族部分である場合、好ましい置換基は、アリール、ヘテロアリール、シクロ脂肪族、ヘテロシクロ脂肪族、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、－Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｏ（ハロアルキル）、－Ｏ（シクロアルキル）、－Ｏ（ヘテロシクロアルキル）、－Ｏ（アリール）、アルキルチオ、アリールチオ、＝Ｏ、＝ＮＨ、＝Ｎ（アルキル）、＝ＮＯＨ、＝ＮＯ（アルキル）、－CO_2H、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）NH_2、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＯＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、アジド、－NH_2、－ＮＨ（アルキル）、－Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨ（アリール）、－ＮＨ（ヒドロキシアルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｈ、－ＮＨＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨＣ（＝ＮＨ）NH_2、－OSO_2（アルキル）、－ＳＨ、－Ｓ（アルキル）、－Ｓ（アリール）、－Ｓ（＝Ｏ）アルキル、－Ｓ（シクロアルキル）、－SO_2（アルキル）、－SO_2NH_2、－SO_2NH（アルキル）および－SO_2N（アルキル）$_2$である。より好ましい置換基は、ハロ、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、－Ｏ（アリール）、＝Ｏ、＝ＮＯＨ、＝ＮＯ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、アジド、－NH_2、－ＮＨ（アルキル）、－Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨ（アリール）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｈ、－ＮＨＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$および－ＮＨＣ（＝ＮＨ）NH_2である。

【００４１】

置換される部分がシクロ脂肪族、ヘテロシクロ脂肪族、アリールまたはヘテロアリール部分である場合、好ましい置換基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、－Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｏ（ハロアルキル）、－Ｏ（アリール）、－Ｏ（シクロアルキル）、－Ｏ（ヘテロシクロアルキル）、アルキルチオ、アリールチオ、－Ｃ（＝Ｏ）（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｈ、－CO_2H、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）NH_2、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＯＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、アジド、－NH_2、－ＮＨ（アルキル）、－Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨ（アリール）、－ＮＨ（ヒドロキシアルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｈ、－ＮＨＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨＣ（＝ＮＨ）NH_2、－OSO_2（アルキル）、－ＳＨ、－Ｓ（アルキル）、－Ｓ（アリール）、－Ｓ（シクロアルキル）、－Ｓ（＝Ｏ）アルキル、－SO_2（アルキル）、－SO_2NH_2、－SO_2NH（アルキル）および－SO_2N（アルキル）$_2$である。より好ましい置換基は、アルキル、アルケニル、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシアルキル、シアノ、ニトロ、アルコキシ、－Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｈ、－CO_2H、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）NH_2、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－ＯＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ（ヒドロキシアルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）NH_2、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$、－NH_2

、－ＮＨ（アルキル）、－Ｎ（アルキル）$_2$、－ＮＨ（アリール）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｈ、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ$_2$、－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ（アルキル）、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｎ（アルキル）$_2$および－ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$である。

【００４２】

「Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル」または「５から１０％」のように範囲が示されている場合、かかる範囲には、最初の例では、Ｃ$_1$およびＣ$_5$、２番目の例では、５％および１０％のような範囲の終点が含まれる。

【００４３】

（例えば、構造式中の関連する立体中心で太字または斜体の結合によって、構造式中でＥまたはＺ配置を有するような二重結合の描写によって、あるいは立体化学命名法の使用によって）特定の立体異性体が特に示されていなければ、純粋な化合物ならびにその混合物として、全ての立体異性体が本発明の範囲に含まれる。特に断りがなければ、各エナンチオマー、ジアステレオマー、幾何異性体、ならびにその組み合わせおよび混合物は、全て本発明に包含される。

【００４４】

当業者は、化合物が本明細書で用いられる構造式中に示されているものと等価である互変異性体型（例えば、ケトおよびエノール型）、共鳴型および双性型を有し、この構造式には、このような互変異性体型、共鳴型または双性型が包含されることを認識する。

【００４５】

「医薬的に許容されるエステル」は、インビボ（例えば、ヒトの体内）で加水分解して親化合物またはその塩を生じるか、あるいはそれ自体、親化合物と同様の活性を有するエステルを意味する。適当なエステルには、Ｃ$_1$－Ｃ$_5$アルキル、Ｃ$_2$－Ｃ$_5$アルケニルまたはＣ$_2$－Ｃ$_5$アルキニルエステル、特に、メチル、エチルまたはｎ－プロピルが含まれる。

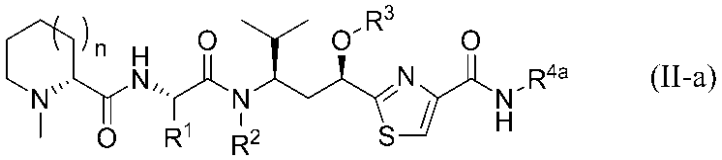
【００４６】

「医薬的に許容される塩」は、医薬製剤に適した化合物の塩を意味する。化合物が１つまたはそれ以上の塩基性基を有する場合、その塩は、酸付加塩、例えば、硫酸塩、臭化水素酸塩、酒石酸塩、メシル酸塩、マレイン酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、塩酸塩、乳酸塩、メチル硫酸塩、フマル酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、メシル酸塩、ラクトビオン酸塩、スベリン酸塩、トシル酸塩などであり得る。化合物が１つまたはそれ以上の酸性基を有する場合、その塩は、塩、例えば、カルシウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、メグルミン塩、アンモニウム塩、亜鉛塩、ピペラジン塩、トロメタミン塩、リチウム塩、コリン塩、ジエチルアミン塩、４－フェニルシクロヘキシルアミン塩、ベンザチン塩、ナトリウム塩、テトラメチルアンモニウム塩などでありうる。多形結晶形態および溶媒和物はまた、本発明の範囲内に包含される。

【００４７】

式（ＩＩ）の化合物の好ましい実施形態は、式（ＩＩ－ａ）によって表される

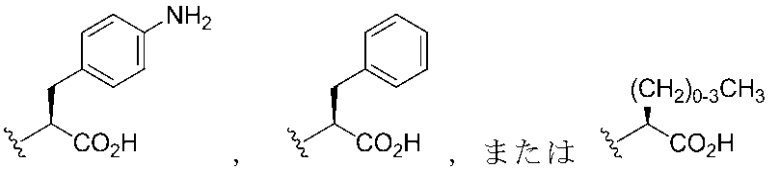
【化６】



(II-a)

［式中、ｎ、Ｒ^1、Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、式（ＩＩ）に関して本明細書中、上記で定義されているとおりであり、Ｒ^{4a}は、

【化７】



である］。

【００４８】

式（ＩＩ－ａ）の化合物では、天然に存在するツブリシンのＴｕｐ／Ｔｕｔに相当するサブユニットは、サイズおよび脂溶性において、少なくとも２個分の炭素、カルボン酸基の直後の２個の脂肪族炭素原子の欠失を介して低減されている。すなわち、アミノ基は、カルボン酸基に対してγ－である代わりに、ここではα－に位置する。Ｒ^{4}が４－アミノフェニルアラニンである場合、アミン基は、脂溶性をさらに低減させる極性部分を形成する。ＳＡＲ研究によって、脂溶性は、ツブリシンおよびそれらの類似体または誘導体の生物学的活性で重要な因子であることが示されている。Steinmetz et al. 2004およびNeri et al. 2006は両方とも、より脂溶性の天然に存在するツブリシン、すなわち、Ｔｕｔサブユニット（式Ｉにおいて、Ｒ^{A}がＯＨである）の代わりに、Ｔｕｐサブユニット（式Ｉにおいて、Ｒ^{A}がＨである）を有するものは、より高い生物学的活性を有することを開示している。さらに、この活性の差異は、Ｔｕｖサブユニット中の１１－アシルオキシ残基（式（Ｉ）中の基Ｒ^{C}）のサイズおよび脂溶性に関わらず保持された（Steinmetz et al. 2004）。これらの結果は、脂溶性Ｔｕｐ／Ｔｕｔサブユニットが特に重要なＳＡＲエレメントであることを示す。

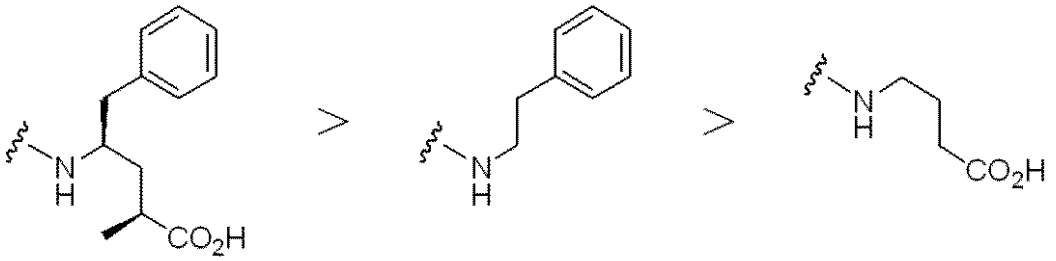
【００４９】

上記の観察は、Balasubramanian et alによる２つの研究において一部確認されている。第１には（Balasubramanian et al. 2008）、Ｔｕｐサブユニット中のカルボキシル基に対してアルファ位の炭素でジメチル化されている類似体が、同じ位置で脱メチル化されているが、その他は同一の類似体と比較されている。インビトロチューブリン阻害ＩＣ$_{50}$が比較されたが、それらの相対的な脂溶性に基づいて予測され得るように、ジメチル化された類似体はより高い抗増殖性活性を有した。しかしながら、この傾向は、３種の類似体（１種はα－炭素脱メチル化、１種はモノメチル化および１種はジメチル化）が比較された第２の研究では同様にいかなかった（Balasubramanian et al. 2009）。その場合、最も活性な類似体は、脱メチル化されたものであったが、モノメチル化されたもの、すなわち、天然Ｔｕｐサブユニットを有するものは、最も低い活性を有するものであった。しかしながら、後者の類似体は、分子中の他の部分に、本質的に不活性にするさらなる修飾を有し、このことによって、あるとすればどのようなＳＡＲ推論を下すことができるかが不明になっている。

【００５０】

Patterson et al. 2007およびEllman et al. 2009は、ツブリシンＤと、フェネチルまたはγ－カルボキシ基のいずれかのみがＴｕｐサブユニット中に保持されている類似体との細胞毒性を比較した。フェネチル保持類似体は、３種の癌細胞株に対してツブリシンＤよりも３．６から１３．６分の１の低い活性を有したが、より低い脂溶性γ－カルボキシル基が保持されている場合、２５．７から６２．５分の１の低い活性である、さらに高い活性の喪失が存在した。すなわち、活性の序列は下記の通りであった：

【化８】

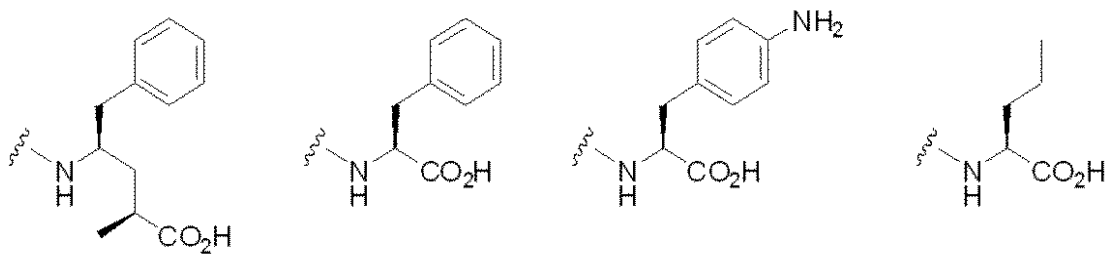


ツブリシンＤ

【００５１】

上記の文献は、個別に、および組み合わせで、Ｔｕｐ位置での脂溶性がツブリシンの生物学的活性に関して特に重要であることを示唆している。したがって、これらの先行技術は、それぞれ、少なくとも２個の脂肪族炭素を失わせ、かつ結果としてＴｕｐ／Ｔｕｔ位置での脂溶性を減少させるであろうことから、Ｔｕｐサブユニットを式（ＩＩ－ａ）に記載のフェニルアラニン（Ｐｈｅ）、４－アミノフェニルアラニン（４－NH_2Ｐｈｅ）、ノルバリンまたは他のR^4サブユニットで置き換えることは望ましくないことを示唆している。

【化９】

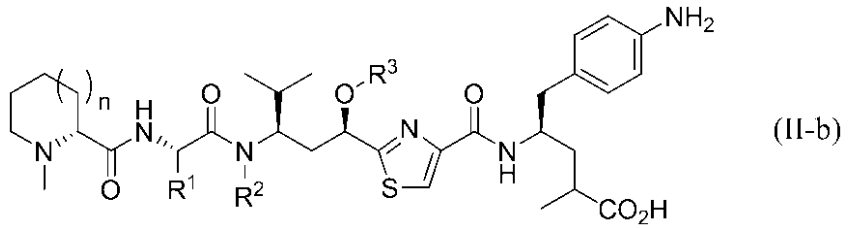


Tup　Phe　4-NH_2Phe　ノルバリン

【００５２】

式（ＩＩ）の化合物の他の好ましい実施形態は、式（ＩＩ－ｂ）によって表される：

【化１０】



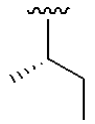
(II-b)

［式中、ｎ、R^1、R^2およびR^3は、式（ＩＩ）に関して本明細書中、上記で定義される通りである］。Ｔｕｐ芳香環の４位に－NH_2基を包含する化学式は、文献中で見出すことができるが（Domling 2005aおよび2005b）、そのような形態を有する化合物の製造方法についての開示は存在していない。

【００５３】

式（ＩＩ）、（ＩＩ－ａ）および（ＩＩ－ｂ）において、R^1は、好ましくは、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニルまたはC_2－C_5アルケニルであり、より好ましくは、イソロイシル基、すなわち：

【化１１】



である。

【００５４】

式（ＩＩ）、（ＩＩ－ａ）および（ＩＩ－ｂ）において、R^2は、好ましくは、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、CH_2O（C_1－C_5アルキル）、CH_2O（C_2－C_5アルケニル）、CH_2O（Ｃ＝Ｏ）（C_1－C_5アルキル）またはCH_2OＣ（＝Ｏ）（C_2－C_5アルケニル）であり；より好ましくは、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMe、CH_2OEt、CH_2O（ｎ－Ｐｒ）、CH_2OC（＝Ｏ）ｉ－Ｂｕ、CH_2OC（＝Ｏ）ｎ－Ｐｒ、CH_2OC（＝Ｏ）$CH=CH_2$またはCH_2OC（＝Ｏ）Ｍｅであり、特に好ましくは、Ｍｅ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMe、CH_2OC（＝Ｏ）ｉ－ＢｕおよびCH_2O（ｎ－Ｐｒ）である。

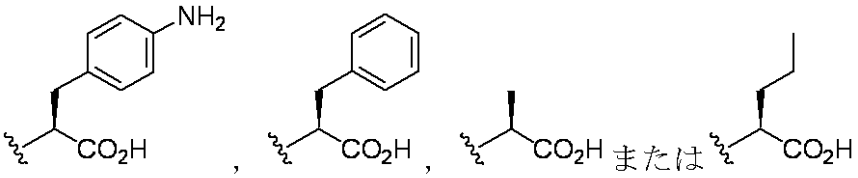
【００５５】

式（ＩＩ）、（ＩＩ－ａ）および（ＩＩ－ｂ）において、R^3は、好ましくは、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、Ｃ（＝Ｏ）C_1－C_5アルキルまたはＣ（＝Ｏ）C_2－C_5アルケニルであり；より好ましくは、Ｈ、Ｍｅ、ＥｔまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅである。

【００５６】

好ましくは、式（ＩＩ）および（ＩＩ－ａ）において、R^4およびR^{4a}は：

【化１２】



である。

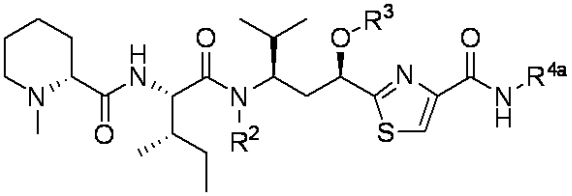
【００５７】

式（ＩＩ）、（ＩＩ－ａ）および（ＩＩ－ｂ）において、、ｎは、好ましくは、１であり、式（ＩＩ）の例において、R^5は、好ましくは、メチルであり；すなわち、Ｍｅｐサブユニット中の環は、好ましくは、Ｎ－メチルピペリジニルのものである

【００５８】

式（ＩＩ－ａ）に記載の化合物の好ましい態様は、式（ＩＩ－ａ’）

【化１３】

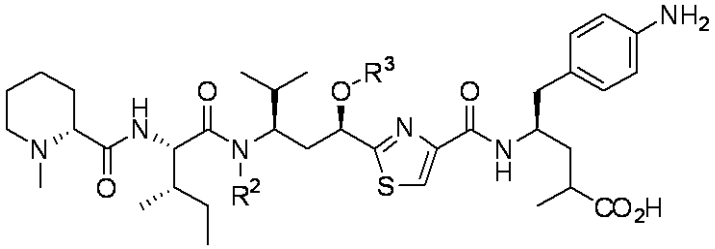


(II-a')

によって示されるものであって、

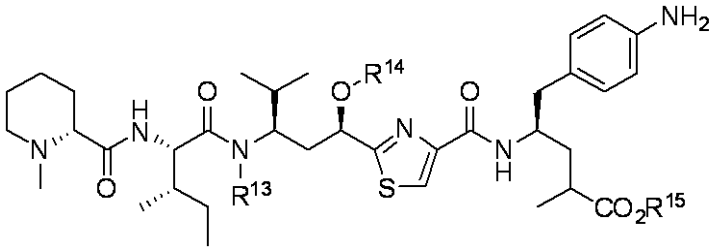
式中、R^{4a}は、式（ＩＩ－ａ）に関して上記で定義されるとおりであり、R^2は、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、CH_2O（C_1－C_5アルキル）、CH_2O（C_2－C_5アルケニル）、CH_2O（Ｃ＝Ｏ）（C_1－C_5アルキル）またはCH_2OC（＝Ｏ）（C_2－C_5アルケニル）であり；およびR^3は、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、Ｃ（＝Ｏ）C_1－C_5アルキルまたはＣ（＝Ｏ）C_2－C_5アルケニルである。好ましくは、R^2は、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMe、CH_2OEt、CH_2OC（＝Ｏ）ｉ－Ｂｕ、CH_2OC（＝Ｏ）ｎ－Ｐｒ、CH_2OC（＝Ｏ）$CH=CH_2$またはCH_2OC（＝Ｏ）Ｍｅであり；より好ましくは、Ｍｅ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMe、CH_2OC（＝Ｏ）ｉ－ＢｕまたはCH_2O（ｎ－Ｐｒ）である。好ましくは、R^3は、Ｈ、Ｍｅ、ＥｔまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅである。

【００５９】
式（ＩＩ－ｂ）に記載の化合物の好ましい態様は、式（ＩＩ－ｂ’）
【化１４】



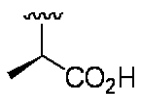
(II-b')

によって示されるものであって、
式中、R^2は、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、CH_2O（C_1－C_5アルキル）、CH_2O（C_2－C_5アルケニル）、CH_2O（Ｃ＝Ｏ）（C_1－C_5アルキル）またはCH_2OC（＝Ｏ）（C_2－C_5アルケニル）であり；およびR^3は、Ｈ、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、Ｃ（＝Ｏ）C_1－C_5アルキルまたはＣ（＝Ｏ）C_2－C_5アルケニルである。好ましくは、R^2は、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMe、CH_2OEt、CH_2OC（＝Ｏ）ｉ－Ｂｕ、CH_2OC（＝Ｏ）ｎ－Ｐｒ、CH_2OC（＝Ｏ）ＣＨ＝CH_2またはCH_2OC（＝Ｏ）Ｍｅであり、およびR^3は、Ｈ、Ｍｅ、ＥｔまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅである。
【００６０】
R^4のカルボキシル基がエステル化される場合、好ましくは、前記エステルは、C_1－C_5アルキルエステル、例えば、Ｍｅ、ＥｔまたはＰｒエステルである。あるいは、前記カルボキシル基は、アンモニアまたはアルキルアミンでアミド化されうる。
【００６１】
別の態様において、本発明は、式（ＩＩ－ｃ）
【化１５】



(II-c)

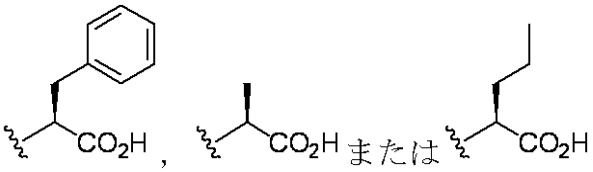
によって表される構造を有する化合物を提供するものであって、
式中、R^{13}は、Ｍｅ、ｎ－Ｐｒ、CH_2OMeまたはCH_2OC（＝Ｏ）CH_2CH（Ｍｅ）$_2$であり；R^{14}は、ＭｅまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅであり；ならびにR^{15}は、ＨまたはC_1－C_5アルキル（好ましくは、Ｈ、ＭｅまたはＥｔ）である。
【００６２】
式（ＩＩ－ｂ）、（ＩＩ－ｂ’）および（ＩＩ－ｃ）において、カルボキシル基に対してアルファに位置するメチルの立体化学は、好ましくは、天然に存在するツブリシン、すなわち：
【化１６】



に相当するものである。
【００６３】
好ましい態様において、本化合物は、R^4（または場合によっては、R^{4a}）におけるカルボキシル基と、α－アミン酸のα－アミン基とのアミド形態である。α－アミノ酸は、タンパク新生アミノ酸、４－アミノフェニルアラニン、ノルバリン、ノルロイシンおよ

びシトルリンからなる群から選択されうる。好ましくは、α－アミノ酸は、アラニン、ノルバリン、グリシン、リシン、アルギニン、シトルリン、ノルロイシン、４－アミノフェニルアラニンおよびフェニルアラニンからなる群から選択される。また、好ましくは、α－アミノ酸の絶対配置は、タンパク新生のもの、すなわち、Ｌ型である。この好ましい態様において、R^4（またはR^{4a}）は、好ましくは：

【化１７】

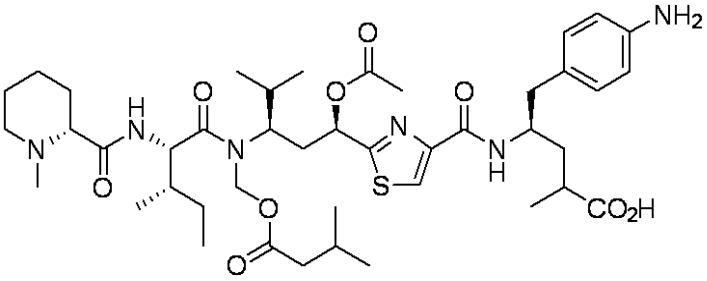


である。

【００６４】

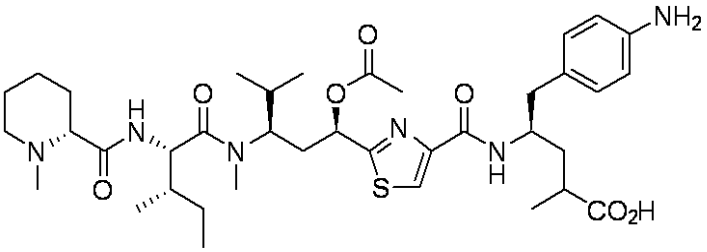
式（ＩＩ）に記載の本化合物の具体的な例には、化合物（ＩＩＩ－ａ）から（ＩＩＩ－ｙ）が含まれる。本化合物のいくつかは、R^4カルボキシル基とα－アミノ酸のα－アミン基とで結合した医薬的に許容されるエステル化合物または医薬的に許容されるアミド化合物あるいはそのメチルエステル化合物として示される。

【化１８】



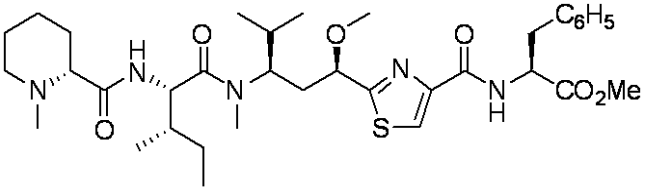
（ＩＩＩ－ａ），

【化１９】



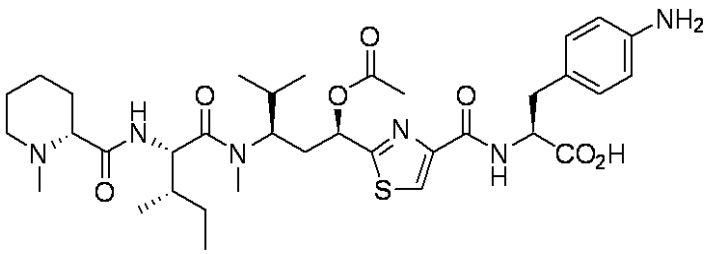
（ＩＩＩ－ｂ），

【化２０】



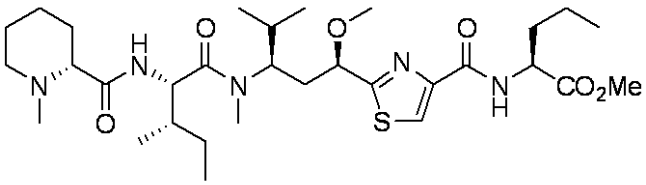
（ＩＩＩ－ｃ），

【化２１】



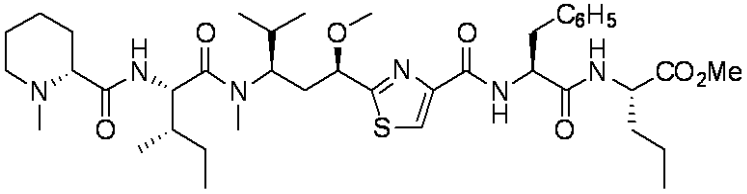
（ＩＩＩ－ｄ），

【化２２】



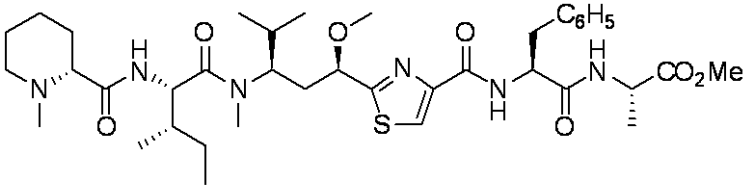
（ＩＩＩ－ｅ），

【化２３】



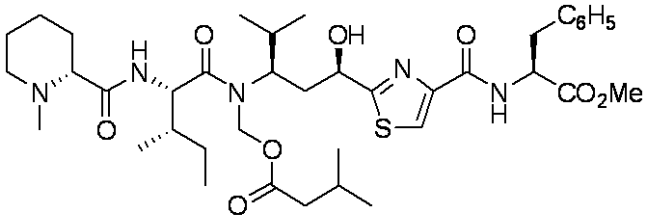
（ＩＩＩ－ｆ），

【化２４】



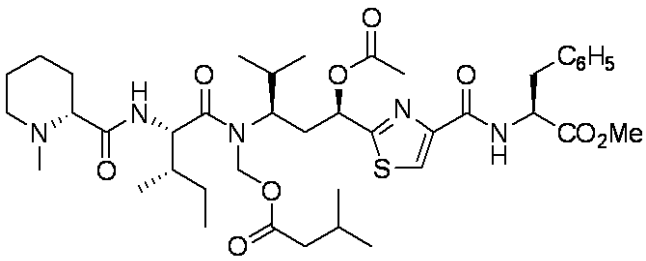
（ＩＩＩ－ｇ），

【化２５】



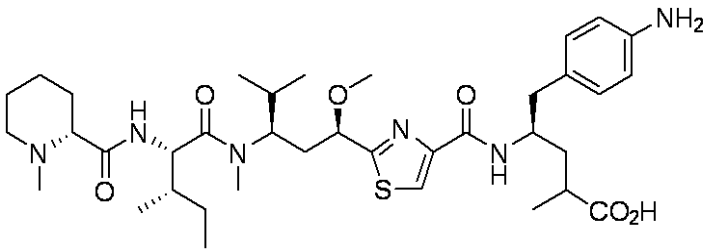
（ＩＩＩ－ｈ），

【化２６】



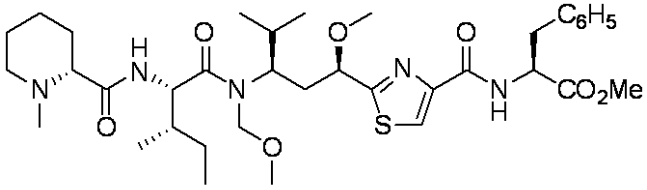
（ＩＩＩ－ｉ），

【化２７】



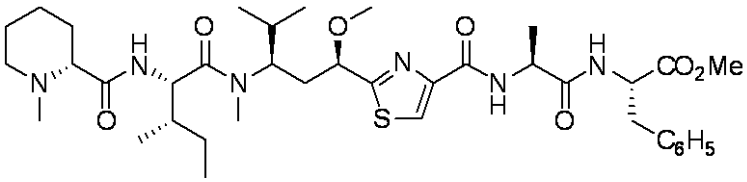
（ＩＩＩ－ｊ），

【化２８】



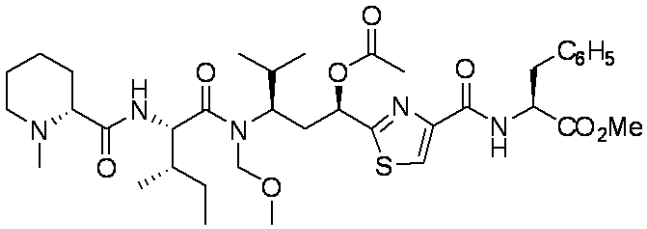
（ＩＩＩ－ｋ），

【化２９】



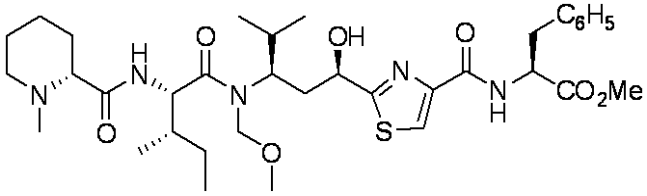
（ＩＩＩ－ｌ），

【化３０】



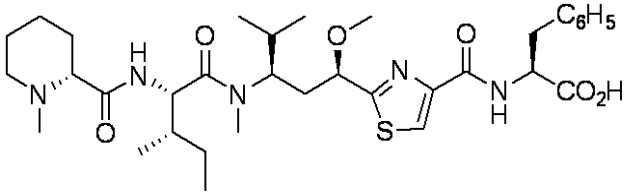
（ＩＩＩ－ｍ），

【化３１】



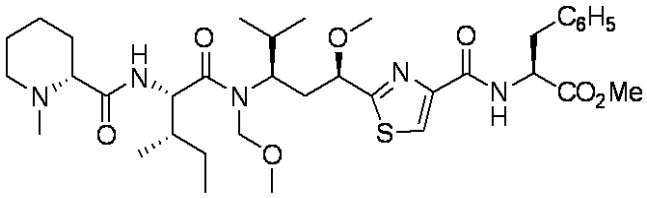
（ＩＩＩ－ｎ），

【化３２】



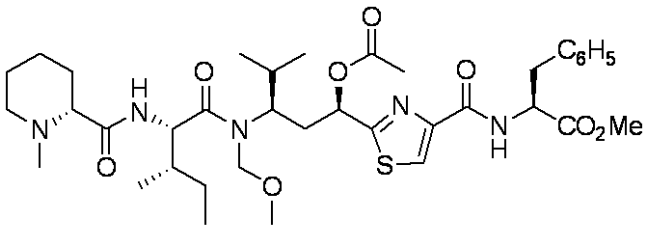
（ＩＩＩ－ｏ），

【化３３】



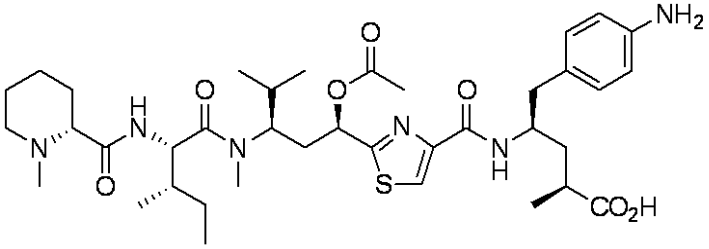
（ＩＩＩ－ｐ），

【化３４】



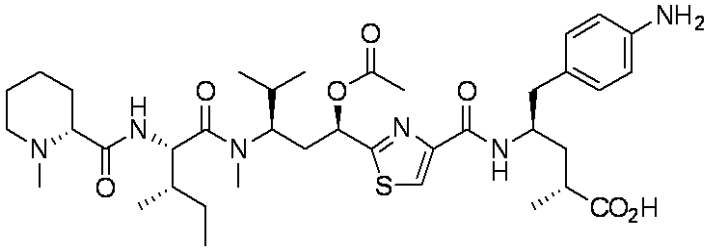
（ＩＩＩ－ｑ），

【化３５】



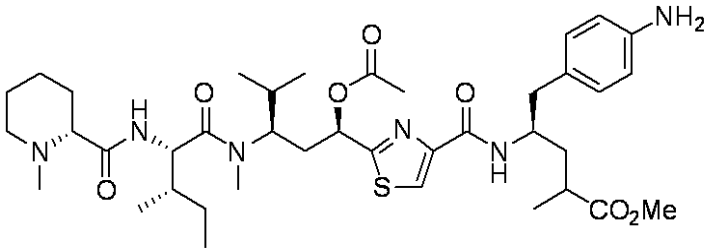
（ＩＩＩ－ｒ），

【化３６】



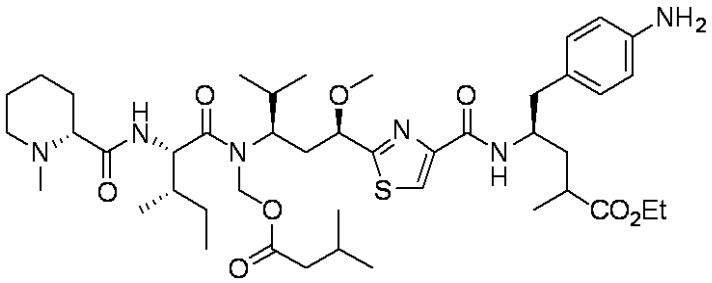
（ＩＩＩ－ｓ），

【化３７】



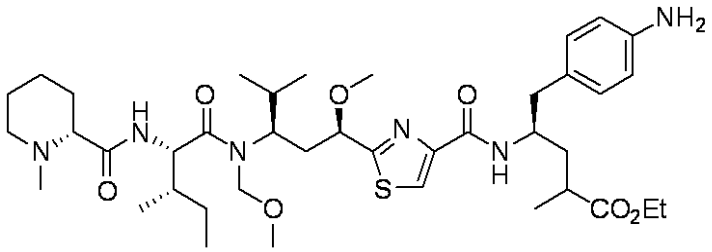
（ＩＩＩ－ｔ），

【化３８】



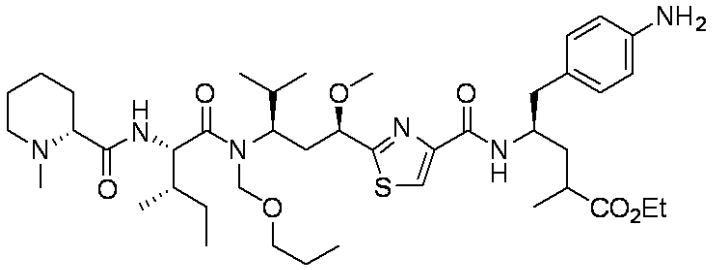
（ＩＩＩ－ｕ），

【化３９】



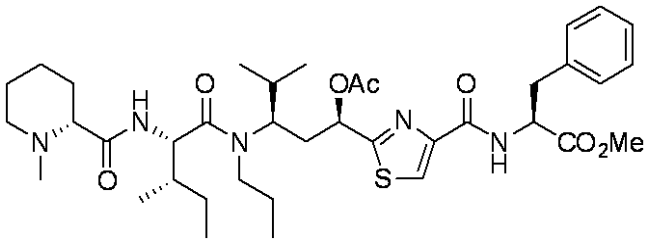
（ＩＩＩ－ｖ），

【化４０】



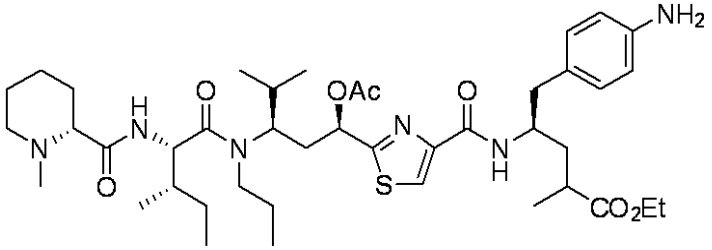
（ＩＩＩ－ｗ），

【化４１】



（ＩＩＩ－ｘ），および

【化４２】



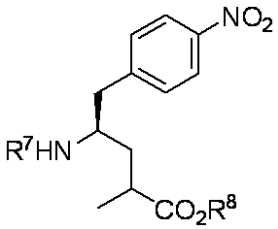
（ＩＩＩ－ｙ）。

【００６５】

本発明はまた、本化合物の合成で利用できる新規な中間体を提供する。式（ＶＩＩＩ－ａ）に記載の化合物は、図面および本明細書の実施例に示されているように、式（ＩＩ）

または（ＩＩ－ｂ）に記載の化合物の調製に用いることができる。

【化４３】



(VIII-a)

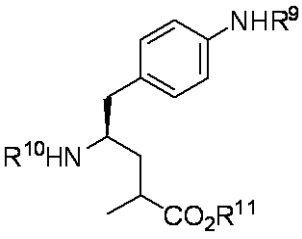
【００６６】

式（ＶＩＩＩ－ａ）において、R^7は、Ｈまたはアミン保護基であり、R^8は、Ｈ、C_1－C_{10}アルキル、C_2－C_{10}アルケニル、C_2－C_{10}アルキニル、アリール、シクロ脂肪族、アルキルシクロ脂肪族、アリールアルキルまたはアルキルアリールである。好ましくは、R^7は、Ｈ、Ｂｏｃ（ｔ－ブトキシカルボニル）、Ｔｒｏｃ（２，２，２－トリクロロエトキシカルボニル）、Ｂｐｏｃ（（１－メチル－１－（４－ビフェニル）エトキシカルボニル））、Ｃｂｚ（ベンジルオキシカルボニル）、Ａｌｏｃ（アリルオキシカルボニル）、メチルアミンまたはＦｍｏｃ（９－フルオレニルメトキシカルボニル）である。好ましくは、R^8は、ＨまたはC_1－C_5アルキル（特に、Ｍｅ）である。

【００６７】

本化合物の合成に有用な別の新規な中間体は、式（ＶＩＩＩ－ｂ）に記載の構造を有する。本化合物を調製するための式（ＶＩＩＩ－ｂ）の化合物の使用は、図面および本明細書の実施例に示されている。

【化４４】



(VIII-b)

【００６８】

式（ＶＩＩＩ－ｂ）において、R^9およびR^{10}は、独立して、Ｈまたはアミン保護基であり、R^{11}は、Ｈ、C_1－C_{10}アルキル、C_2－C_{10}アルケニル、C_2－C_{10}アルキニル、アリール、シクロ脂肪族、アルキルシクロ脂肪族、アリールアルキルまたはアルキルアリールである。好ましくは、R^9およびR^{10}は、独立して、Ｈ、Ｂｏｃ、Ｔｒｏｃ、Ｂｐｏｃ、Ｃｂｚ、Ａｌｏｃ、メチルアミンおよびＦｍｏｃから選択される。好ましくは、R^{11}は、ＨまたはC_1－C_5アルキル（特に、Ｍｅ）である。好ましくは、R^9およびR^{10}が各々アミン保護基である場合、それらは異なるアミン保護基である。

【００６９】

式（ＶＩＩＩ－ａ）および（ＶＩＩＩ－ｂ）の化合物のためのさらなる適当なアミン保護基は、出典明示により本明細書に取り込まれるGreene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, pp. 464-653 (John Wiley & Sons, New York, 1999)で開示されている。

【００７０】

他の態様では、式（ＩＶ）によって表される本発明による細胞毒性化合物およびリガンドを含む抱合体を提供する：

$$[D(X^D)_aC(X^Z)_b]_mZ \quad (IV)$$

［式中、Ｚはリガンドであり；Ｄは、本発明による細胞毒性化合物であり；－$(X^D)_aC(X^Z)_b$－は、これらがＺおよびＤを結合するため、「リンカー部分」または「リンカー」と総称される］。リンカー内において、Ｃは、化合物Ｄの目的の生物学的作用部位で切断されるように設計されている切断可能な基であり；X^DおよびX^Zは、これらは、

ＤとＣおよびＣとＺの間をそれぞれ空けるため、スペーサー部分（または「スペーサー」）と総称され；下付文字ａおよびｂは独立して０または１であり（すなわち、X^Dおよび／またはX^Zは適宜存在する）；ならびに下付文字ｍは、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０（好ましくは１、２、３または４）である。Ｄ、X^D、Ｃ、X^ZおよびＺは、下記の本明細書中でより十分に定義される。

【００７１】

リガンドＺ、例えば、抗体は、標的とする機能を供する。その抗原または受容体が局在する標的組織または細胞に結合することによって、リガンドＺは、その抱合体をそこへ方向付ける。好ましくは、標的組織または細胞は、癌組織または細胞であり、抗原または受容体は、腫瘍関連抗原、すなわち、癌性細胞によってユニークに発現されるか、あるいは非癌性細胞と比較して癌細胞によって過剰発現される抗原である。標的組織または細胞で基Ｃが切断されることにより、化合物Ｄが放出され、局所的にその細胞毒性作用が付与される。ある場合において、この抱合体は、エンドサイトーシスによって標的細胞中に内部移行され、切断が標的細胞内で起こる。このようにして、化合物Ｄの正確な送達が、目的の作用部位で達成され、その結果、必要な投薬が低減される。また、化合物Ｄは、通常、その抱合された状態で生物学的に不活性（または、顕著に低い活性）であり、これにより、標的ではない組織または細胞に対して望ましくない毒性が減少される。抗癌薬は、多くの場合、一般に細胞に対して高い毒性を有するので、これは重要な問題である。

【００７２】

下付文字ｍによって表されるように、リガンドＺの各分子は、抱合のために利用できる部位Ｄの数および用いられる実験条件に応じて、１個より多い化合物Ｄと抱合しうる。当業者は、リガンドＺの個々の分子それぞれが整数個の化合物Ｄと抱合される一方で、抱合体の製剤は、統計平均を反映して、化合物Ｄのリガンドに対する非整数比に関して分析されうることを認める。

【００７３】

リガンドＺおよびその抱合体

好ましくは、リガンドＺは、抗体である。利便性と簡略化のためであって、限定するものではないが、リガンドＺの抱合について本明細書中で詳述されている以後の記載は、それが抗体であるという文脈で記載されているが、当業者であれば、他のタイプのリガンドＺが必要な変更を加えて抱合できることを理解するであろう。例えば、リガンドとしての葉酸との抱合体は、その表面上に葉酸受容体を有する細胞を標的とし得る（Vlahov et al. 2008a、2008bおよび2010; Leamon et al. 2009）。同じ理由で、下記の詳細な説明は、主に、抗体Ｚの化合物Ｄに対する１：１比率に関して記載されている。

【００７４】

好ましくは、リガンドＺは、腫瘍関連抗原に対する抗体であり、そのようなリガンドＺを含む抱合体は、癌細胞を選択的に標的とすることが可能である。このような抗原の例には、メソテリン、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ７０、Ｂ７Ｈ４（Ｏ８Ｅとしても公知）、タンパク質チロシンキナーゼ７（ＰＴＫ７）、ＲＧ１、ＣＴＬＡ－４およびＣＤ４４が包含される。抗体は、動物（例えば、マウス）、キメラであるか、ヒト化されているか、または好ましくは、ヒトであってよい。抗体は、好ましくは、モノクローナル、特にモノクローナルヒト抗体である。前記抗原のうちの一部に対するヒトモノクローナル抗体の調製は、ＫｏｒｍａｎらのＵＳ２００９／００７４６６０Ａ１（Ｂ７Ｈ４）；Ｒａｏ－ＮａｉｋらのＵＳ２００９／０１４２３４９Ａ１Ａ２（ＣＤ１９）；ＫｉｎｇらのＷＯ２００８／０７０５６９Ａ２（ＣＤ２２）；ＫｅｌｅｒらのＵＳ７，３８７，７７６Ｂ２（２００８）（ＣＤ３０）；ＴｅｒｒｅｔｔらのＵＳ２００９／００２８８７２Ａ１（ＣＤ７０）；ＫｏｒｍａｎらのＵＳ６，９８４，７２０Ｂ１（２００６）（ＣＴＬＡ－４）；ＫｏｒｍａｎらのＵＳ２００９／０２１７４０１Ａ１（ＰＤ－１）；Ｈｕａｎｇらの２００８／０２７９８６８Ａ１（ＰＳＭＡ）；ＬｕらのＵＳ２０１０／００３４８２６Ａ１号（ＰＴＫ７）；ＨａｒｋｉｎｓらのＵＳ７，３３５，７４８Ｂ２（２００８）（ＲＧ１）；ＴｅｒｒｅｔｔらのＷＯ２００９／０４５９５

７Ａ１（メソテリン）；およびＸｕらのＵＳ２０１０／００９２４８４Ａ１（ＣＤ４４）に開示されており；それらの開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【００７５】

リガンドＺはまた、アフィボディ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、ナノボディ、ユニボディ、ＤＡＲＰｉｎ、アンチカリン、ヴァーサボディ、デュオカリン、リポカリンまたはアヴィマー（avimer）などの抗体フラグメントまたは抗体模倣物質であってもよい。

【００７６】

リガンドＺ上のいくつかの異なる反応性基のうちのいずれか１つが抱合部位であり得、これには、リシン残基中のε－アミノ基、懸垂炭水化物部分、カルボン酸基、ジスルフィド基およびチオール基が包含される。反応性基の各タイプは、いくつかの利点と欠点を有するトレードオフを示す。抱合に適した抗体反応性基に関する総説については、例えば、出典明示により本明細書に取り込まれるGarnett, Adv. Drug Delivery Rev. 53 (2001), 171-216およびDubowchik and Walker, Pharmacology & Therapeutics 83 (1999), 67-123を参照されたい。

【００７７】

一実施形態では、リガンドＺは、リシンε－アミノ基を介して抱合される。ほとんどの抗体は、複数の露出したリシンε－アミノ基を有し、（下記の本明細書でさらに記載されているように）ヘテロ二官能性薬剤を用いた修飾を包含する当分野で公知の技術を用いて、アミド、尿素、チオ尿素またはカルバメート結合を介して抱合されうる。しかしながら、多くのε－アミノ基のうちのどの基を反応させ、どのような方法で反応させるを制御することは困難であり、抱合体の調製時にバッチ間で異なる可能性が存在する。また、抱合は、抗体の元々の立体構造を維持するために重要なプロトン化ε－アミノ基の中和を引き起こすことがあり、あるいは抗原結合部位の付近またはその部位のリシンで生じることがあるが、いずれも望ましくない。

【００７８】

他の実施形態では、リガンドＺは、多くの抗体がグリコシル化されているように、炭水化物側鎖を介して抱合されうる。この炭水化物側鎖は、過ヨウ素酸塩で酸化されてアルデヒド基を発生し、次いでアミンと反応して、セミカルバゾン、オキシムまたはヒドラゾンなどの中でイミン基を形成しうる。所望であれば、このイミン基は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元することによって、より安定なアミン基に変換することができる。炭水化物側鎖を介した抱合についてのさらなる開示においては、例えば、出典明示により本明細書に組み込まれるRodwell et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83、2632-2636 (1986)を参照されたい。リシンε－アミノ基を用いる場合と同様に、抱合部位の位置および化学量論の再現性に関して懸念がある。

【００７９】

さらなる別の実施形態では、リガンドＺは、カルボン酸基を介して抱合されうる。一実施形態では、末端カルボン酸基は、官能化されてカルボヒドラジドを生じ、次いでアルデヒドを保有する抱合部分と反応される。Fisch et al., Bioconjugate Chemistry 1992, 3, 147-153を参照されたい。

【００８０】

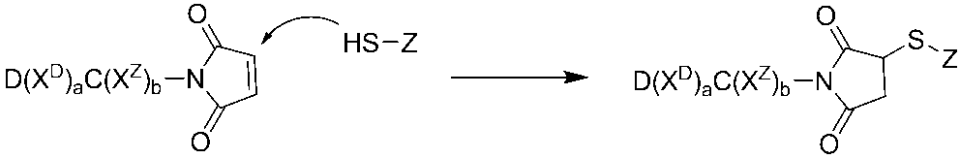
なお別の実施形態では、抗体Ｚは、抗体Ｚ上のシステイン残基および抱合体の他の部分上の硫黄を架橋するジスルフィド基を介して抱合されうる。いくつかの抗体は、遊離のチオール（スルフヒドリル）基を欠如しているが、例えば、ヒンジ領域にジスルフィド基を有する。このような場合、遊離チオール基は、元々のジスルフィド基を還元させることによって調製することができる。次いで、このようにして調製されたチオール基は、抱合のために用いることができる。例えば、出典明示により本明細書に組み込まれるPackard et al., Biochemistry 1986, 25, 3548-3552; King et al., Cancer Res. 54, 6176-6185 (1994);およびDoronina et al., Nature Biotechnol. 21(7), 778-784 (2003)を参照されたい。この場合も、抱合部位の位置および化学量論、ならびに抗体の元々の構造に起こり得る破壊に関する懸念が存在する。

【００８１】
多くの方法は、元々のジスルフィド結合を壊すことなく、遊離チオール基を抗体に導入するために知られており、これらの方法は、本発明のリガンドＺを用いて実施することができる。用いられる方法に応じて、予測可能な数の遊離スルフヒドリルを所定の位置に導入することが可能である。ある手法では、システインが別のアミノ酸に置換されている変異抗体が調製される。例えば、ＥｉｇｅｎｂｒｏｔらのＵＳ２００７／００９２９４０Ａ１；Chilkoti et al., Bioconjugate Chem. 1994, 5, 504-507；ＵｒｎｏｖｉｔｚらのＵＳ４，６９８，４２０（１９８７）；Stimmel et al., J. Biol. Chem., 275(39), 30445-30450(2000)；ＢａｍらのＵＳ７，３１１，９０２Ｂ２（２００７）；Kuan et al., J. Biol. Chem., 269(10), 7610-7618(1994)； Poon et al., J. Biol. Chem., 270(15), 8571-8577(1995)を参照されたい。他の手法では、さらなるシステインがＣ末端に加えられる。例えば、Cumber et al., J. Immunol., 149, 120-126 (1992)；King et al, Cancer Res., 54, 6176-6185 (1994); Li et al.. Bioconjugate Chem., 13, 985-995(2002)；Yang et al., Protein Engineering, 16, 761-770(2003)；およびOlafson et al., Protein Engineering Design & Selection, 17. 21-27 (2004)を参照されたい。遊離システインを導入するための好ましい方法は、LiuらのＷＯ２００９／０２６２７４Ａ１が教示するものであり、この方法では、システインを有するアミノ酸配列が抗体の重鎖のＣ末端に加えられる。この方法は、既知の数のシステイン残基（重鎖１つ当たり１個）を、抗原結合部位から離れた既知の位置に導入するものである。この段落で引用されている文献の開示は、全て出典明示により本明細書に取り込まれる。

【００８２】
さらなる別の実施形態では、リシンε－アミノ基は、２－イミノチオランまたはＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）－プロピオネート（ＳＰＤＰ）などのヘテロ二官能性試薬を用いて改変されて、ε－アミノ基をチオールまたはジスルフィド基に変換し、いわばシステイン代替物が調製されうる。しかしながら、この方法は、適当なε－アミノ基と同じ抱合位置および化学量論の制限を受ける。

【００８３】
さらなる別の好ましい実施形態では、リガンドＺは、チオール基の求核性付加生成物を介して受容部分に抱合される。好ましい受容部分は、マレイミド基であり、その抗体チオール基との反応は、下記で一般的に図示される。このチオール基は、元々のものであるか、または上記のように導入されたものであってよい。

【化４５】



【００８４】
リンカー－（Ｘ^{D}）$_{a}$Ｃ（Ｘ^{Z}）$_{b}$－
上記のように、本発明の抱合体のリンカー部分は、３個までのエレメント、すなわち、切断可能な基Ｃ、ならびに任意のスペーサーＸ^{Z}およびＸ^{D}を含む。

【００８５】
切断可能な基Ｃは、生理学的条件下で切断可能な基であり、好ましくは、抱合体が血漿中で全身に循環している間は比較的安定であるが、抱合体がその目的の作用部位、すなわち、標的細胞付近、その位置またはその中に達すると容易に切断されるように選択される。好ましくは、前記抱合体は、抗体Ｚが標的細胞の表面上に提示される抗原に結合すると、標的細胞によるエンドサイトーシスによって内部移行される。その後、基Ｃの切断は、標的細胞の小胞体（初期エンドソーム、後期エンドソームまたは特にリソソーム）で起きる。

【００８６】

一実施形態では、基Ｃは、ｐＨ感受性の基である。血漿中のｐＨは中性よりもやや高いが、リソソーム内部のｐＨは約５の酸性である。よって、その切断が酸で触媒される基Ｃは、血漿中の速度よりもリソソーム内部では数桁も速い速度で切断される。適切な酸感受性の基の例には、出典明示により本明細書に組み込まれるＳｈｅｎらのＵＳ４，６３１，１９０（１９８６）；ＳｈｅｎらのＵＳ５，１４４，０１１（１９９２）；Shen et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 1048-1054(1981)およびYang et al., Proc. Natl Acad. Sci (USA). 85, 1189-1193(1988)に記載されるように、ｃｉｓ－アコニチルアミドおよびヒドラゾンが包含される。

【００８７】

別の実施形態において、基Ｃは、ジスルフィドである。ジスルフィドは、周囲チオール濃度に依存した速度でチオール－ジスルフィド交換メカニズムによって切断され得る。グルタチオンおよび他のチオールの細胞内濃度がそれらの血清濃度よりも高いため、ジスルフィドの切断速度は細胞内でより高い。さらに、チオール－ジスルフィド交換の速度は、ジスルフィドの立体化学的および電子的特性（例えば、アルキル－アリールジスルフィド対アルキル－アルキルジスルフィド；アリール環上での置換など）を調節し、高まった血清安定性または特定の切断速度を有するジスルフィド結合を設計することによって改変することができる。抱合体におけるジスルフィド切断可能な基に関するさらなる開示については、例えば、出典明示により本明細書に取り込まれるThorpe et al., Cancer Res. 48, 6396-6403 (1988)； ＳａｎｔｉらのＵＳ２００５／０２８７１５５Ａ１；ＮｇらのＵＳ６，９８９，４５２Ｂ２（２００６）；ＮｇらのＷＯ２００２／０９６９１０Ａ１；ＢｏｙｄらのＵＳ７，６９１，９６２Ｂ２；およびＳｕｆｉらのＷＯ２００８／０８３３１２Ａ２を参照されたい。

【００８８】

好ましい基Ｃは、血清中のプロテアーゼによる切断とは対照的に、目的とする作用部位でプロテアーゼによって優先的に切断されるペプチド結合を含む。典型的には、基Ｃは、１から２０個のアミノ酸、好ましくは１から６個のアミノ酸、より好ましくは１から３個のアミノ酸を含む。アミノ酸は、天然および／または非天然α－アミノ酸でありうる。天然アミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるものか、さらに、それに由来するアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタメート、シトルリンおよびＯ－ホスホセリンである。用語アミノ酸にはまた、アミノ酸類似体および模倣物が包含される。類似体は、天然アミノ酸と同じ一般的なH_2N（Ｒ）ＣＨＣＯ$_2$Ｈ構造を有する化合物であるが、但し、Ｒ基が天然アミノ酸の中では見出されないものである。類似体の例には、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニン－スルホキシドおよびメチオニンメチルスルホニウムが包含される。アミノ酸模倣物質は、α－アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、それと同様に機能する化合物である。用語「非天然アミノ酸」は、「Ｄ」立体化学的形態を表すことが意図されており、天然アミノ酸は「Ｌ」形態である。

【００８９】

好ましくは、基Ｃは、プロテアーゼのための切断認識配列であるアミノ酸配列を含有する。多くの切断認識配列は当分野で公知である。例えば、その開示が参照によって本明細書に組み込まれるMatayoshi et al. Science 247: 954(1990)；Dunn et al. Meth. Enzymol. 241: 254(1994)；Seidah et al. Meth. Enzymol. 244: 175(1994)；Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615(1994)；Weber et al. Meth. Enzymol. 244: 595(1994)；Smith et al. Meth. Enzymol. 244: 412(1994);およびBouvier et al. Meth. Enzymol. 248: 614(1995)を参照されたい。

【００９０】

細胞によって内部移行されることが意図されていない抱合体においては、基Ｃは、標的組織付近の細胞外マトリックスに存在するプロテアーゼ、例えば、付近の死滅細胞から放出されるプロテアーゼまたは腫瘍関連プロテアーゼによって切断されるように選択することができる。典型的な細胞外腫瘍関連プロテアーゼとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、チメットオリゴペプチダーゼ（ＴＯＰ）およびＣＤ１０である。

【００９１】
細胞によって内部移行されるように設計される抱合体においては、基Ｃは、好ましくは、エンドソームまたはリソソームプロテアーゼ、特にリソソームプロテアーゼによる切断について選択されたアミノ酸配列を含む。このようなプロテアーゼの非限定的な例には、カテプシンＢ、Ｃ、Ｄ、Ｈ、ＬおよびＳ、特にカテプシンＢが包含される。カテプシンＢは、配列－ＡＡ^{2}－ＡＡ^{1}－（式中、ＡＡ^{1}は塩基性または強水素結合性アミノ酸（リシン、アルギニンまたはシトルリンなど）であり、ＡＡ^{2}は疎水性アミノ酸（フェニルアラニン、バリン、アラニン、ロイシンまたはイソロイシンなど）である）、例えば、Ｖａｌ－Ｃｉｔ（ここで、Ｃｉｔはシトルリンを示す）またはＶａｌ－Ｌｙｓでペプチドを優先的に切断する。（この場合、文脈が特に示していない限り、アミノ酸配列は、H_2N－ＡＡ^{2}－ＡＡ^{1}－CO_2Hのように、Ｎ－から－Ｃ方向に記されている）。カテプシン－切断基に関するさらなる情報については、出典明示により本明細書に組み込まれるDubowchik et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 8, 3341-3346(1998); Dubowchik et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 8 3347-3352(1998);およびDubowchik et al., Bioconjugate Chem. 13, 855-869(2002)を参照されたい。ペプチジルリンカーの切断に利用できる別の酵素としては、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎを優先的に切断するリソソームシステインプロテアーゼであるレグマインである。

【００９２】
一実施形態において、基Ｃは、２つのアミノ酸配列－ＡＡ^{2}－ＡＡ^{1}（ここで、ＡＡ^{1}はリシン、アルギニンまたはシトルリンであり、ＡＡ^{2}は、フェニルアラニン、バリン、アラニン、ロイシンまたはイソロイシンである）を含むペプチドである。別の実施形態において、Ｃは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ、Ｃｉｔ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｓｎ、Ｌｙｓ、Ｃｉｔ、ＳｅｒおよびＧｌｕからなる群から選択される１から５個のアミノ酸からなる配列からなる。

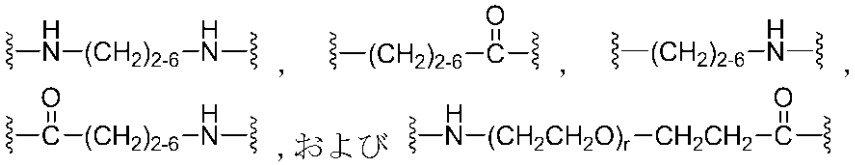
【００９３】
単一のアミノ酸からなる切断可能な基Ｃの調製および設計は、その開示が参照によって本明細書に組み込まれるＣｈｅｎらのＵＳ２０１０／０１１３４７６Ａ１に開示されている。

【００９４】
基Ｃはまた、光切断可能なもの、例えば、光への曝露時に切断されるニトロベンジルエーテルであってよい。

【００９５】
基Ｃは、抗体Ｚまたは化合物Ｄに直接結合していてもよい。すなわち、場合によっては、スペーサーX^{Z}およびX^{D}は存在しなくてもよい。例えば、基Ｃがジスルフィドである場合、２個の硫黄のうちの１個は、抗体Ｚ上のシステイン残基またはその代替物であってよい。あるいは、基Ｃは、抗体の炭水化物側鎖上のアルデヒドに結合しているヒドラゾンであってもよい。あるいは、基Ｃは、抗体Ｚのリシンε－アミノ基と一緒に形成されたペプチド結合であってよい。好ましい実施形態において、化合物Ｄは、化合物Ｄにおけるカルボキシルまたはアミン基へのペプチジル結合を介して基Ｃに直接結合されている。

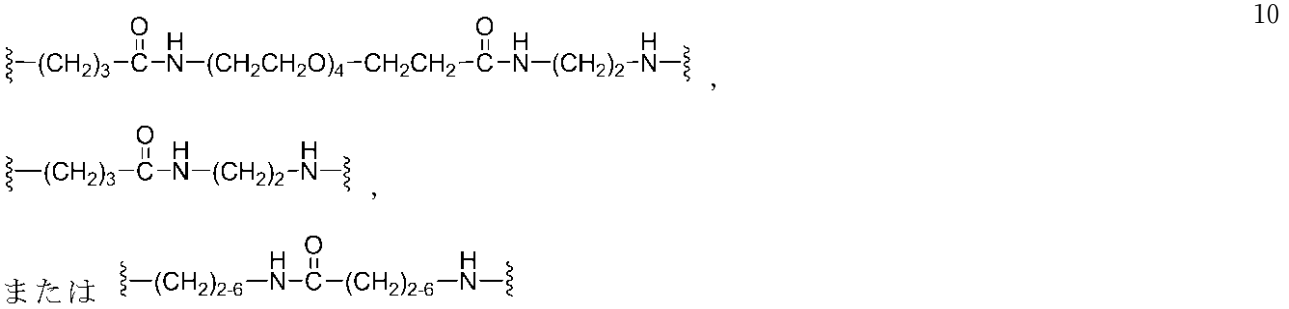
【００９６】
スペーサーX^{Z}は、存在する場合、基Ｃが抗体Ｚによる抗原結合を立体的に障害しないように、または抗体Ｚが基Ｃの切断を立体的に障害しないように、基Ｃと抗体Ｚとの間に空間的な分離を提供する。さらに、スペーサーX^{Z}は、高い溶解性または低い凝集特性を抱合体に与えるために用いることができる。スペーサーX^{Z}は、あらゆる組み合わせで組み立てることができる１つまたはそれ以上のモジュラーセグメントを含んでよい。スペーサーX^{Z}に適切なセグメントの例としては下記である：

【化４６】



［式中、下付文字ｒは、１から２４、好ましくは２から４である］。これらのセグメントが組み合わされて、

【化４７】



などのスペーサーＸ^{Z}を調製することができる。

【００９７】

スペーサーＸ^{D}は、存在する場合、化合物Ｄが基Ｃの切断を立体的にまたは電子的に障害しないように、基Ｃと化合物Ｄとの間に空間的な分離を提供する。スペーサーＸ^{D}はまた、さらなる分子量および化学官能性を抱合体に導入するために用いられ得る。一般に、さらなる質量および官能性は、抱合体の血清半減期および他の特性に影響を及ぼすはずである。したがって、スペーサー基の賢明な選択により、抱合体の血清半減期を調節することができる。スペーサーＸ^{Z}について上記したように、スペーサーＸ^{D}もまた、モジュラーセグメントから組み立てることができる。

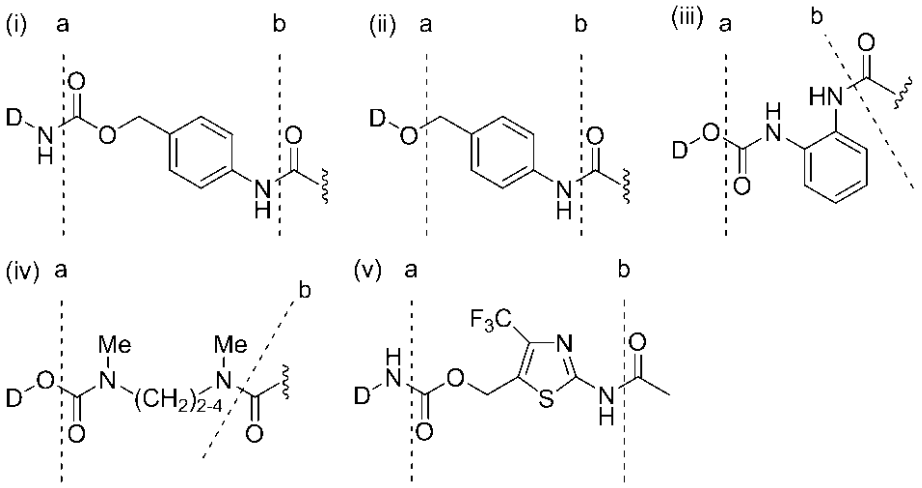
【００９８】

スペーサーＸ^{Z}もしくはＸ^{D}のいずれかまたは両方は、自己犠牲部分を含んでいてもよい。自己犠牲部分は、（１）基Ｃと抗体Ｚまたは細胞毒素Ｄのいずれかに結合し、かつ（２）基Ｃからの切断が、反応順序を開始し、場合によっては、抗体Ｚまたは細胞毒素Ｄから自己犠牲部分自体の剥離を生じるような構造を有する部分である。言い換えると、抗体Ｚまたは細胞毒素Ｄから離れた部位での反応（基Ｃからの切断）が、Ｘ^{Z}－ＺまたはＸ^{D}－Ｄ結合の分裂を引き起こす。自己犠牲部分は、スペーサーＸ^{D}の場合に存在することが望ましい。なぜなら、抱合体からの切断後、スペーサーＸ^{D}またはその部分が細胞毒素Ｄに結合したままであると、抗体Ｚの生物学的活性が損なわれることがあるためである。自己犠牲部分の使用は、切断可能な基Ｃがポリペプチドである場合に特に望ましい。

【００９９】

パートナー分子Ｄ上のヒドロキシルまたはアミノ基に結合する典型的な自己犠牲部分（ｉ）～（ｖ）は、下記に示されている：

【化４８】



【０１００】

自己犠牲部分は、点線ａおよびｂの間の構造であり、内容を示すために示されている隣接する構造特徴を有している。自己犠牲部分（ｉ）および（ｖ）は、化合物Ｄ－ＮＨ$_2$に結合している（すなわち、化合物Ｄはアミノ基を介して抱合されている）一方で、自己犠牲部分（ｉｉ）、（ｉｉｉ）および（ｉｖ）は、化合物Ｄ－ＯＨに結合している（すなわち、化合物Ｄは、ヒドロキシルまたはカルボキシル基を介して抱合されている）。点線ｂでアミド結合が切断されると、アミド窒素がアミン窒素として放出され、反応順序が開始されて点線ａで結合の切断が生じ、場合によっては、結果としてＤ－ＯＨまたはＤ－ＮＨ$_2$の放出が生じうる。自己犠牲部分に関するさらなる開示については、出典明示により本明細書に取り込まれるCarl et al., J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981)；ＣａｒｌらのＷＯ８１／０１１４５（１９８１）；Dubowchik et al., Pharmacology & Therapeutics, 83, 67-123 (1999)；ＦｉｒｅｓｔｏｎｅらのＵＳ６，２１４，３４５Ｂ１（２００１）；Toki et al., J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002)；Doronina et al., Nature Biotechnology 21 (7), 778-784 (2003) (erratum, p. 941)；ＢｏｙｄらのＵＳ７，６９１，９６２Ｂ２；ＢｏｙｄらのＵＳ２００８／０２７９８６８Ａ１；ＳｕｆｉらのＷＯ２００８／０８３３１２Ａ２；ＦｅｎｇらのＵＳ７，３７５，０７８Ｂ２；およびＳｅｎｔｅｒらのＵＳ２００３／００９６７４３Ａ１を参照されたい。

【０１０１】

化合物Ｄ－リンカー組成物

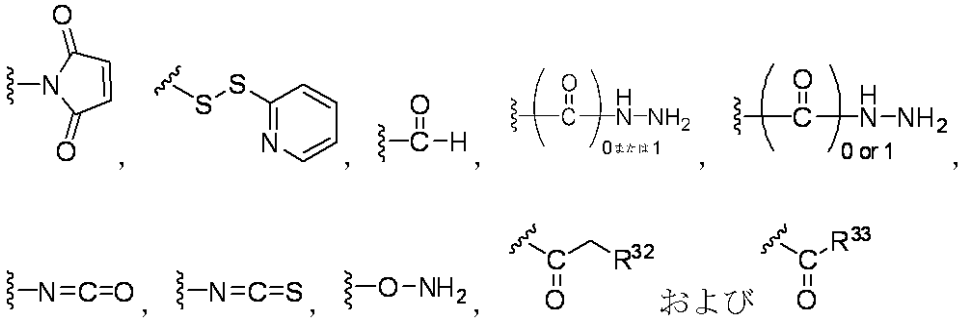
本発明の抱合体は、好ましくは、化合物Ｄおよびリンカー（Ｘ^D）$_a$Ｃ（Ｘ^Z）$_b$を最初に結合させて、式（Ｖ－ａ）：

Ｄ－（Ｘ^D）$_a$Ｃ（Ｘ^Z）$_b$－Ｒ^{31}　　（Ｖ－ａ）

［式中、Ｒ^{31}は、抗体Ｚ上の官能基と反応して抱合体を形成するのに適した官能基である］

によって表される薬物リンカー組成物を生成することによって調製される。適当な基Ｒ^{31}の例には：

【化４９】

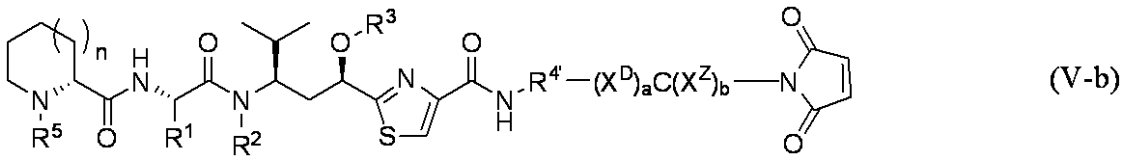


［式中、
Ｒ３２は、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｆ、メシレートまたはトシレートであり、Ｒ３３は、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、Ｆ、ＯＨ、－Ｏ－Ｎ－スクシンイミジル、－Ｏ－（４－ニトロフェニル）、－Ｏ－ペンタフルオロフェニルまたは－Ｏ－テトラフルオロフェニルである］
が含まれる。適当な部分Ｄ－（Ｘ^{D}）$_{a}$Ｃ（Ｘ^{Z}）$_{b}$－Ｒ３１の調製に一般的に有効な化学合成は、出典明示により本明細書に取り込まれる、ＮｇらのＵＳ７，０８７，６００Ｂ２（２００６）；Ｎｇらの米国特許第６，９８９，４５２Ｂ２号（２００６）；Ｎｇらの米国特許第７，１２９，２６１Ｂ２号（２００６）；ＮｇらのＷＯ０２／０９６９１０Ａ１；Ｂｏｙｄらの米国特許第７，６９１，９６２Ｂ２号；Ｃｈｅｎらの米国特許第２００６／０００４０８１Ａ１号；Ｇａｎｇｗａｒらの米国特許第２００６／０２４７２９５Ａ１号；Ｂｏｙｄらの米国特許第２００８／０２７９８６８Ａ１号；Ｇａｎｇｗａｒらの米国特許第２００８／０２８１１０２Ａ１号；Ｇａｎｇｗａｒらの米国特許第２００８／０２９３８００Ａ１号；ＳｕｆｉらのＷＯ２００８／０８３３１２Ａ２；およびＣｈｅｎらの米国特許第２０１０／０１１３４７６Ａ１号に開示されている。

【０１０２】

好ましい態様において、Ｒ３１は、マレイミド基であり、細胞毒性化合物－リンカー分子は、式（Ｖ－ｂ）：

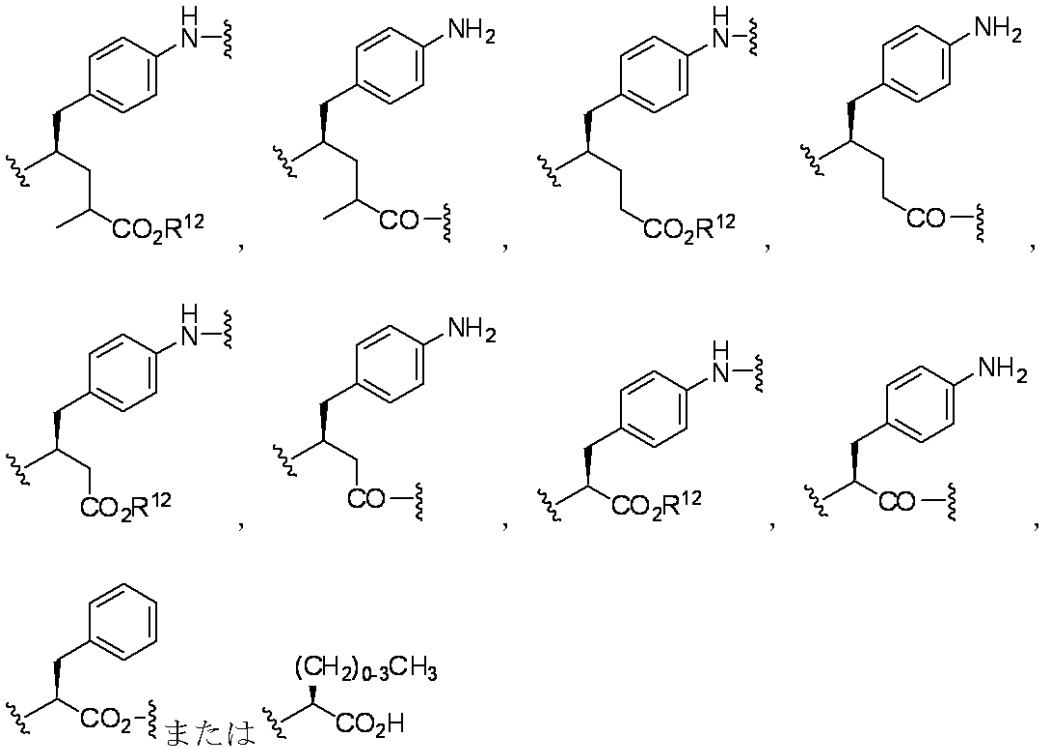
【化５０】



(V-b)

［式中、
ｎは、０、１または２であり；
Ｒ１、Ｒ２およびＲ３は、独立して、Ｈ、無置換または置換Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル、無置換または置換Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル、無置換または置換Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル、無置換または置換アリール、無置換または置換ヘテロアリール、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$Ｏ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換（ＣＨ$_{2}$）$_{1-2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルケニル）、無置換または置換Ｃ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{10}$アルキニル）、無置換または置換シクロ脂肪族、無置換または置換ヘテロシクロ脂肪族、無置換または置換アリールアルキル、あるいは無置換または置換アルキルアリールであり；
Ｒ４’は、

【化５１】



であって、

R^{12}は、H、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニルまたはC_2－C_5アルキニルであり；ならびに

R^5は、H、C_1－C_5アルキル、C_2－C_5アルケニル、C_2－C_5アルキニル、CO（C_1－C_5アルキル）、CO（C_2－C_5アルケニル）またはCO（C_2－C_5アルキニル）であり；

X^DおよびX^Zは、スペーサー基であり；

Cは、切断可能な基であり；ならびに

aおよびbは、独立して、0または1であって；

基$R^{4'}$は、aが1である場合に基X^Dまたはaが0である場合に基Cのいずれかに対して、カルボキシルまたはアミン基を介して結合している］

によって表されうる。

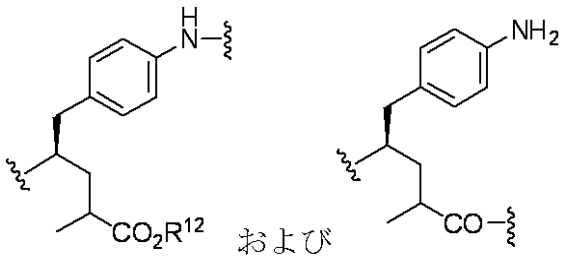
【０１０３】

好ましくは、$R^{4'}$におけるカルボキシルまたはアミン基と、基X^DまたはCとの結合は、場合によっては、アミド結合による。

【０１０４】

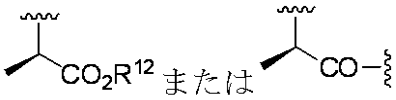
構造

【化５２】



において、カルボキシル基に対してアルファに位置するメチル基の立体化学は、好ましくは、天然に存在するツブリシンのもの、すなわち：

【化５３】

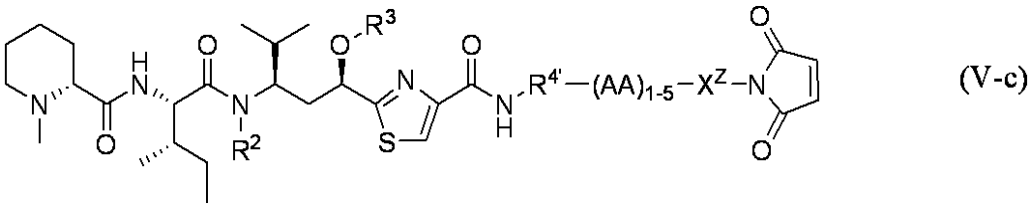


に相当する。

【０１０５】

好ましくは、式（Ｖ－ｂ）において、ｎは、１であり、Ｒ^{1}は、イソロイシン残基であり、ａは、０であり、ｂは、１であり、Ｃは、１から５個のアミノ酸（好ましくは、１から２個）であり、Ｒ^{4}’は、酵素学的に切断可能であるペプチジル結合によってＣに結合されており、Ｒ^{5}は、Ｍｅである。この好ましい態様は、式（Ｖ－ｃ）：

【化５４】



(V-c)

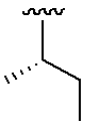
によって表され、

ここで、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}およびＲ^{4}’は、式（Ｖ－ｂ）に関して定義されるとおりであり、各ＡＡは、独立して、天然アミノ酸であり、Ｘ^{Z}は、ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$ＮＨＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{2-5}$またはＣ（＝Ｏ）（ＣＨ$_{2}$）$_{2-5}$である。好ましいアミノ酸ＡＡは、リシン、シトルリン、アラニン、バリン、グリシンおよびフェニルアラニンである。

【０１０６】

式（Ｖ－ｂ）において、Ｒ^{1}は、好ましくは、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニルまたはＣ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニルであり、より好ましくはイソロイシン残基、すなわち：

【化５５】



である。

【０１０７】

式（Ｖ－ｂ）および（Ｖ－ｃ）において、Ｒ^{2}は、好ましくは、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）、ＣＨ$_{2}$Ｏ（Ｃ＝Ｏ）（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル）またはＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル）であり；より好ましくは、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、ＣＨ$_{2}$ＯＭｅ、ＣＨ$_{2}$ＯＥｔ、ＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）ｉ－Ｂｕ、ＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）ｎ－Ｐｒ、ＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）ＣＨ＝ＣＨ$_{2}$またはＣＨ$_{2}$ＯＣ（＝Ｏ）Ｍｅである。

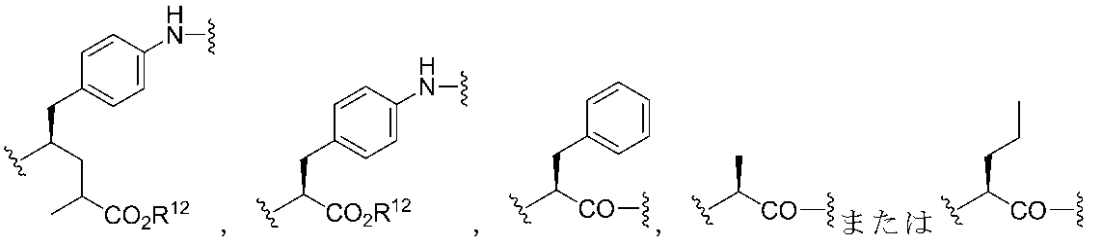
【０１０８】

式（Ｖ－ｂ）および（Ｖ－ｃ）において、Ｒ^{3}は、好ましくは、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニル、Ｃ（＝Ｏ）Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$アルキルまたはＣ（＝Ｏ）Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{5}$アルケニルであり；より好ましくは、Ｈ、Ｍｅ、ＥｔまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅである。

【０１０９】

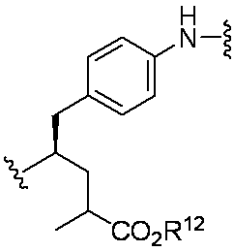
式（Ｖ－ｂ）および（Ｖ－ｃ）において、Ｒ^{4}’は、好ましくは、

【化５６】



であり、Ｒ４’は、

【化５７】



であって、Ｒ１２は、Ｈ、ＭｅまたはＥｔであることが特に好ましい。

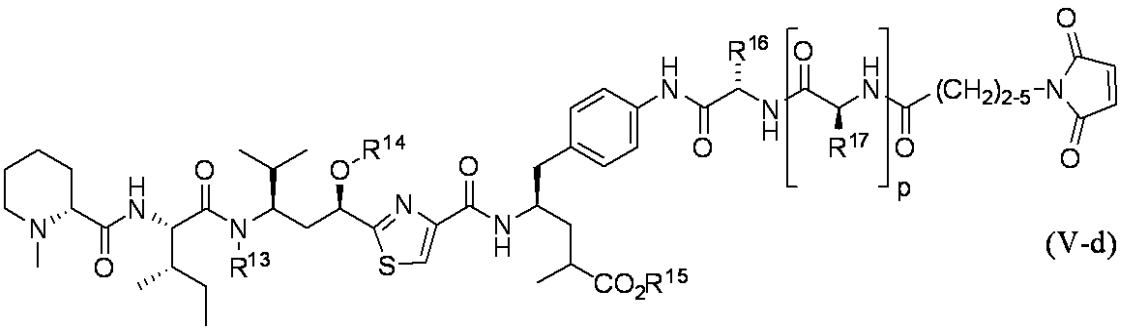
【０１１０】

式（Ｖ－ｂ）において、ｎは、好ましくは、１であり、Ｒ５は、好ましくは、メチルであり；すなわち、Ｍｅｐサブユニット中の環は、好ましくは、Ｎ－メチルピペリジニルのものである。

【０１１１】

別の態様において、本発明は、式（Ｖ－ｄ）

【化５８】



(V-d)

によって表される構造を有する化合物を提供するものであり、

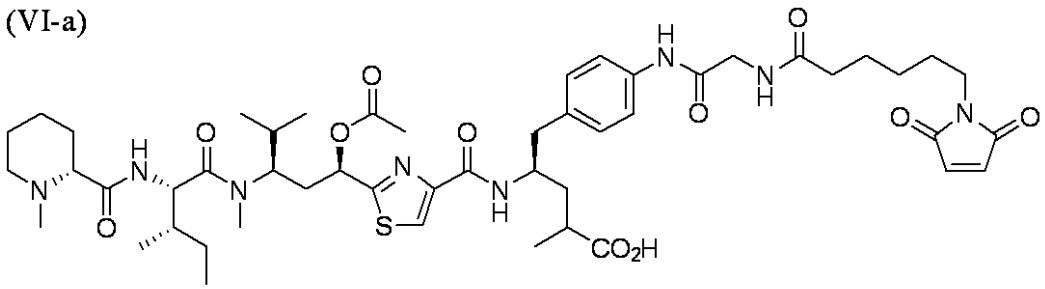
式中、Ｒ１３は、Ｍｅ、ｎ－Ｐｒ、ＣＨ２ＯＭｅまたはＣＨ２ＯＣ（＝Ｏ）ＣＨ２ＣＨ（Ｍｅ）２であり；Ｒ１４は、ＭｅまたはＣ（＝Ｏ）Ｍｅであり；Ｒ１５は、ＨまたはＣ１－Ｃ５アルキル（好ましくは、Ｈ、ＭｅまたはＥｔ）であり；Ｒ１６は、リシン（（ＣＨ２）４ＮＨ２）またはシトルリン（（ＣＨ２）３ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ２）側鎖基であり；Ｒ１７は、バリン（Ｃ（Ｍｅ）２）またはアラニン（Ｍｅ）側鎖基であり；ｐは、０または１である。

【０１１２】

本発明の具体的な細胞毒性化合物リンカー構築物の例は、以下に式（ＶＩ－ａ）から（ＶＩ－ｔ）として示される。化合物－リンカー（ＶＩ－ｎ）が特に好ましい。それらは、マレイミド基を有し、下記のような手順によってそのスルフヒドリル基を介して抗体に抱合するために準備されている。

【化５９】

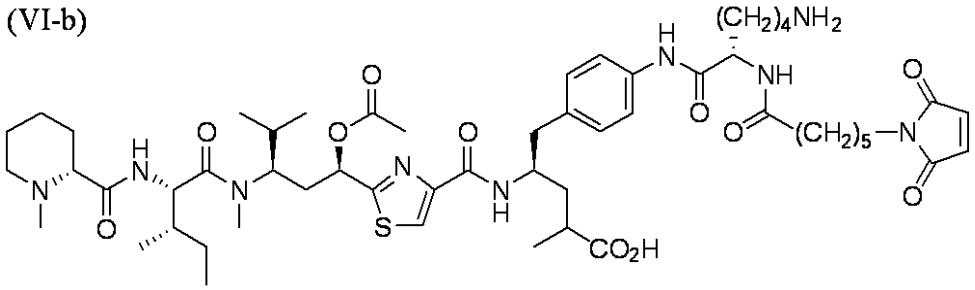
(VI-a)



,

【化６０】

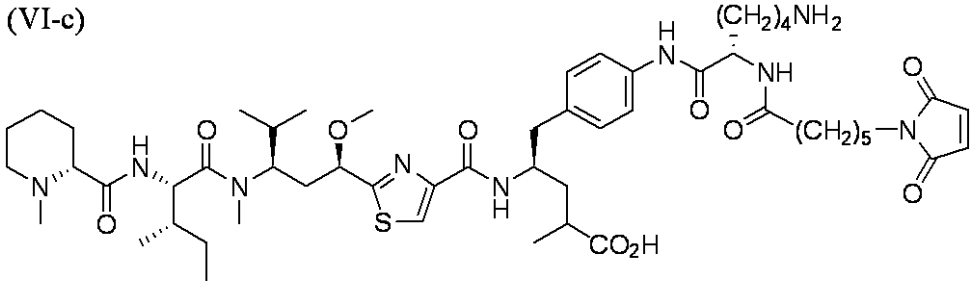
(VI-b)



,

【化６１】

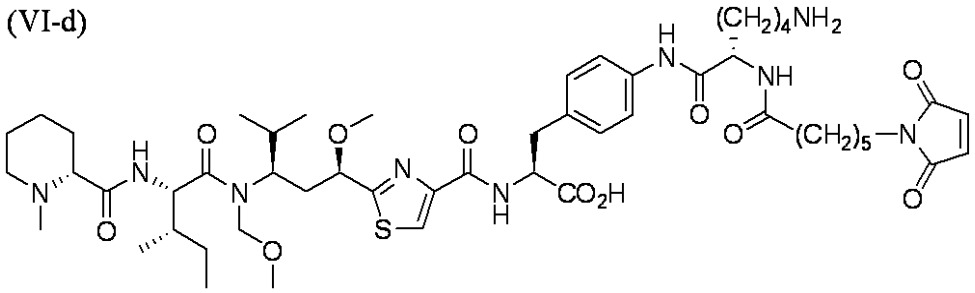
(VI-c)



,

【化６２】

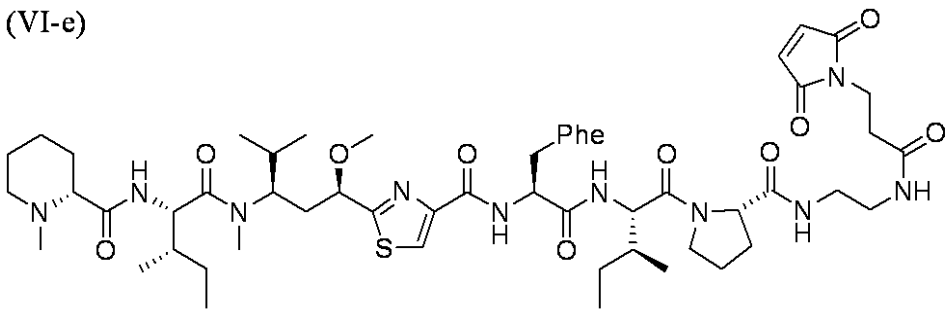
(VI-d)



,

【化６３】

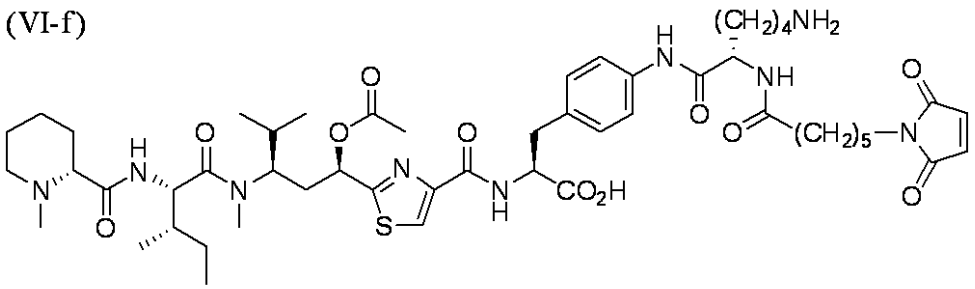
(VI-e)



,

【化６４】

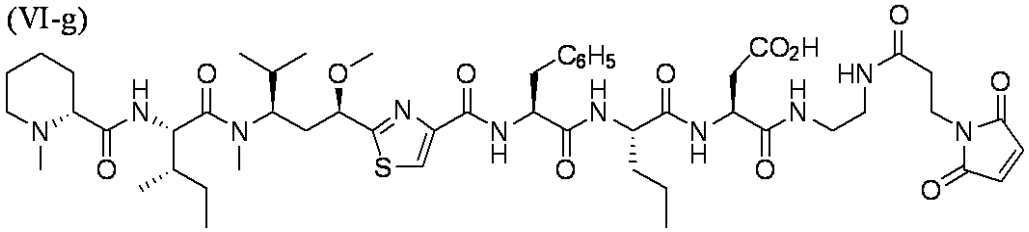
(VI-f)



,

【化６５】

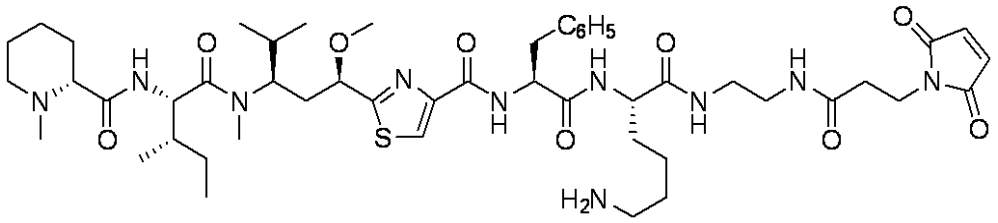
(VI-g)



,

【化６６】

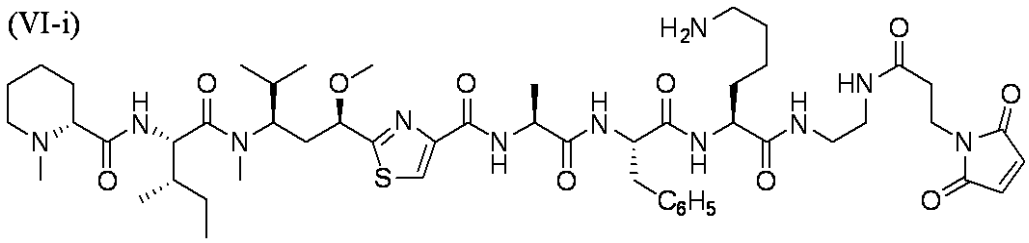
(VI-h)



,

【化６７】

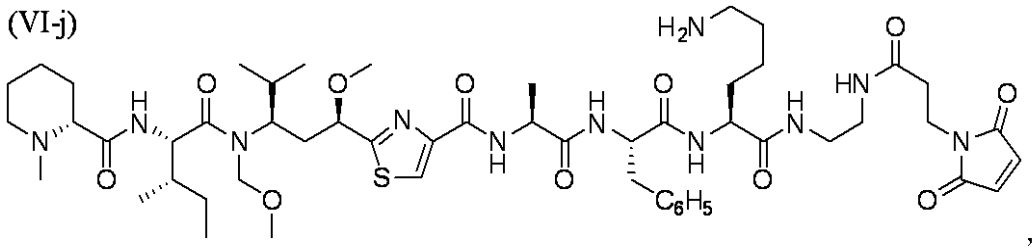
(VI-i)



,

【化６８】

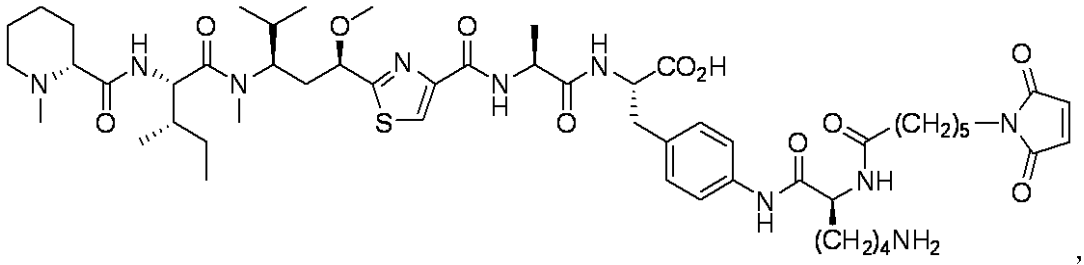
(VI-j)



,

【化６９】

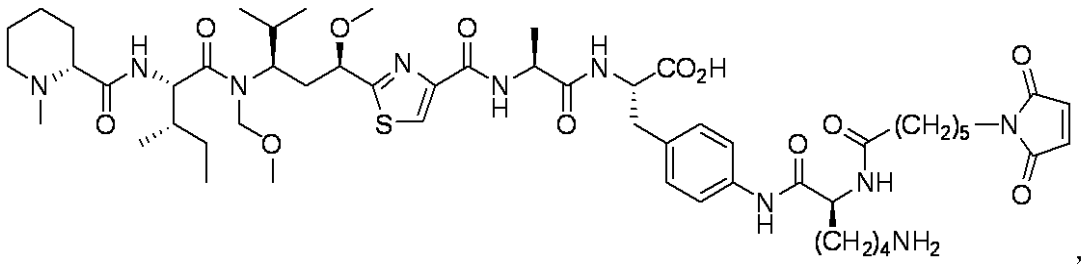
(VI-k)



,

【化７０】

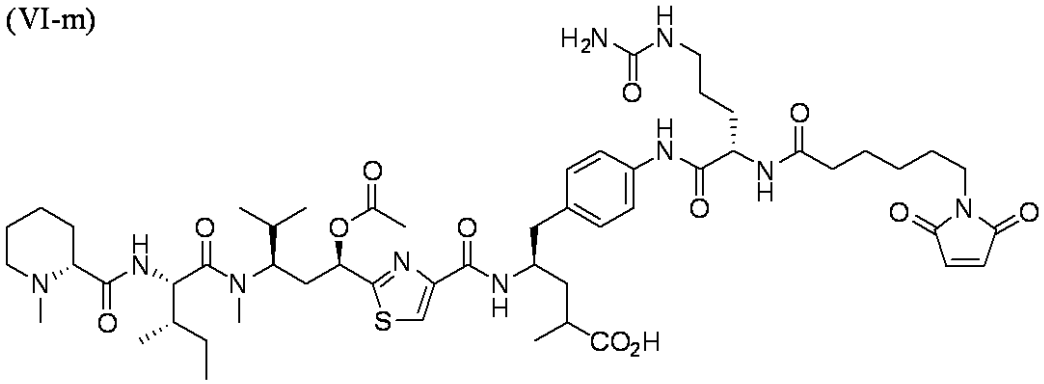
(VI-l)



,

【化７１】

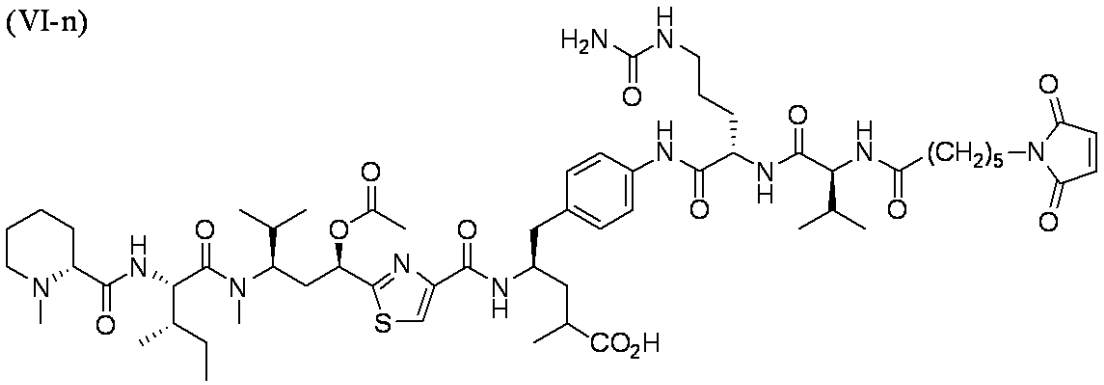
(VI-m)



,

【化７２】

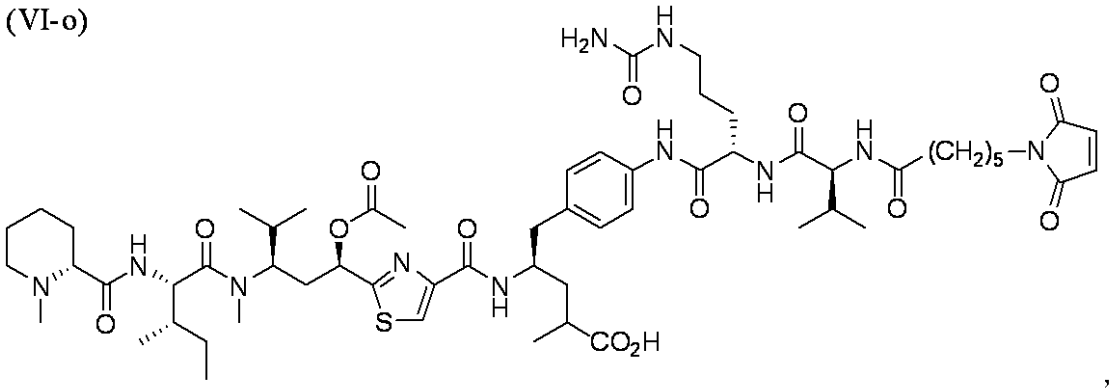
(VI-n)



,

【化７３】

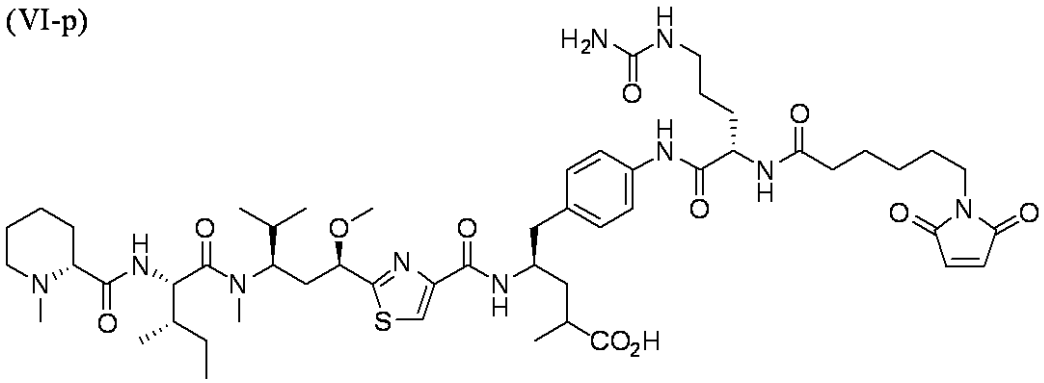
(VI-o)



,

【化７４】

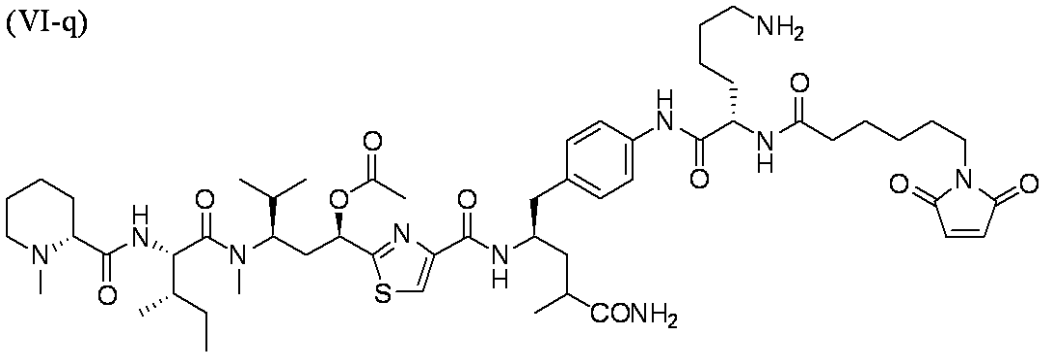
(VI-p)



および

【化７５】

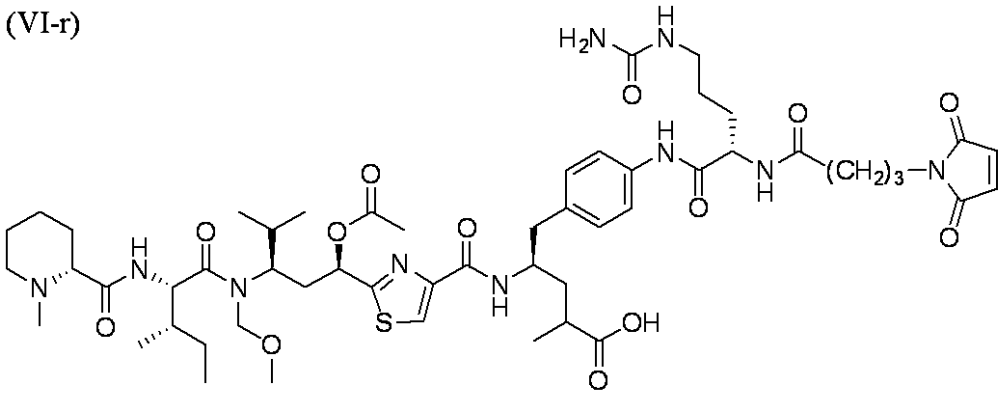
(VI-q)



,

【化７６】

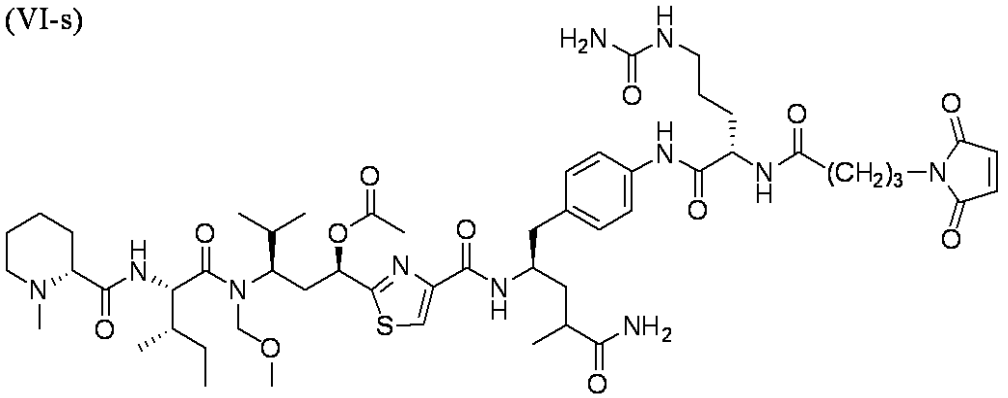
(VI-r)



,

【化７７】

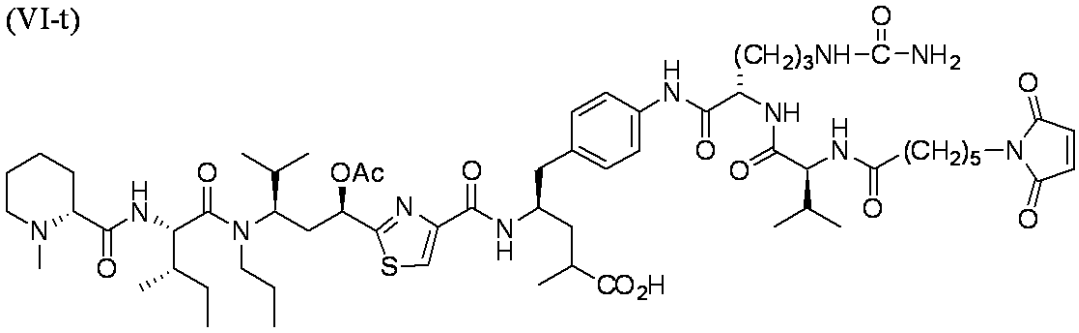
(VI-s)



および

【化７８】

(VI-t)



【０１１３】

下記は、リシンε－アミノ基を２－イミノチオランと反応させ、続いて、上記のようなマレイミド含有薬物－リンカー部分と反応させることによって、遊離チオール基を抗体に導入することに基づく例示的な手順である。最初に、抗体は、５０ｍＭのＮａＣｌおよび２ｍＭのジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）を含有する０．１Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）中で緩衝液を交換され、５～１０ｍｇ／ｍＬに濃縮される。チオール化は、前記抗体に２－イミノチオランを付加することによって達成される。加えられる２－イミノチオランの量は、先行実験によって決定することができ、抗体ごとに変動する。先行実験において、２－イミノチオランの増加量の滴定液が抗体に加えられ、続いて、抗体と室温（室温、約２５℃）で１時間インキュベートされ、抗体は、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ－２５カラムを用いて５０ｍＭのｐＨ６．０　ＨＥＰＥＳ緩衝液中で脱塩され、導入されたチオール基の数は、ジチオジピリジン（ＤＴＤＰ）と反応させることによって迅速に決定される。チオール基とＤＴＤＰとの反応によって、チオピリジンが遊離され、これを３２４ｎｍで分光学的にモニターされうる。０．５～１．０ｍｇ／ｍＬのタンパク質

濃度の試料が典型的に用いられる。２８０ｎｍでの吸光度は、試料中のタンパク質の濃度を正確に決定するために用いることができ、次いで、各試料のアリコット（０．９ｍＬ）は、０．１ｍＬのＤＴＤＰ（エタノール中で５ｍＭのストック溶液）と室温で１０分間インキュベートされる。緩衝液のみとＤＴＤＰとの盲験試料もまた、並べてインキュベートされる。１０分後、３２４ｎｍでの吸光度で測定され、チオール基の数は、１９，８００M^{-1}のチオピリジンの吸光係数を用いて定量される。

【０１１４】

典型的には、抗体１個当たり約３個のチオール基のチオール化レベルが望ましい。例えば、ある抗体を用いると、これは、１５倍モル過剰量の２－イミノチオランを加え、続いて室温で１時間インキュベーションすることによって達成することができる。次いで、抗体は、２－イミノチオランと所望のモル比でインキュベートされ、次いで、抱合緩衝液（５ｍＭのグリシンおよび２ｍＭのＤＴＰＡを含有する５０ｍＭのｐＨ６．０　ＨＥＰＥＳ緩衝液）中で脱塩される。チオール化物質は氷上で維持され、その間に導入されたチオールの数が上記のように定量される。

【０１１５】

導入されたチオールの数が確認された後、薬物－リンカー部分がチオール１個当たり３倍モル過剰量で加えられる。抱合反応は、５％　ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）の最終濃度または同様の代わりの溶媒を含有する抱合緩衝液中で進められる。一般に、薬物－リンカーストック溶液は、１００％　ＤＭＳＯ中に溶解される。ストック溶液は、チオール化抗体に直接加えられ、十分量のＤＭＳＯを加えて１０％の最終濃度にするか、または１０％　ＤＭＳＯの最終濃度含有する抱合緩衝液中で予め希釈し、続いて同等体積のチオール化抗体に加えられる。

【０１１６】

抱合反応混合物は、撹拌しながら室温で２時間インキュベートされる。インキュベーション後、抱合反応混合物は、遠心分離され、０．２μｍフィルターで濾過される。抱合体の精製は、多くの方法を用いてクロマトグラフィーによって達成することができる。ある方法において、抱合体は、５ｍＭのグリシンおよび５０ｍＭのＮａＣｌを含有する５０ｍＭのｐＨ７．２　ＨＥＰＥＳ緩衝液で予め平衡にしたＳＥＰＨＡＣＲＹＬ（商標）Ｓ２００カラム上でサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製される。クロマトグラフィーは２８ｃｍ／ｈの線流速で行われる。抱合体を含有するフラクションが収集され、貯留され、濃縮される。別の方法において、精製は、イオン交換クロマトグラフィーに通して達成することができる。条件は、抗体ごとに変動し、各場合で最適化されるべきである。例えば、抗体－薬物抱合体反応混合物は、５ｍＭのグリシンを含有する５０ｍＭのｐＨ５．５　ＨＥＰＥＳ中で予め平衡化されたＳＰ－ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）カラムに適用される。抗体抱合体は、ｐＨ５．５で平衡緩衝液中で０～１ＭのＮａＣｌ勾配を用いて溶出される。抱合体を含有する該当フラクションは貯留され、製剤緩衝液（５ｍＭのグリシンおよび１００ｍＭのＮａＣｌを含有する５０ｍＭのｐＨ７．２　ＨＥＰＥＳ緩衝液）に対して透析される。

【０１１７】

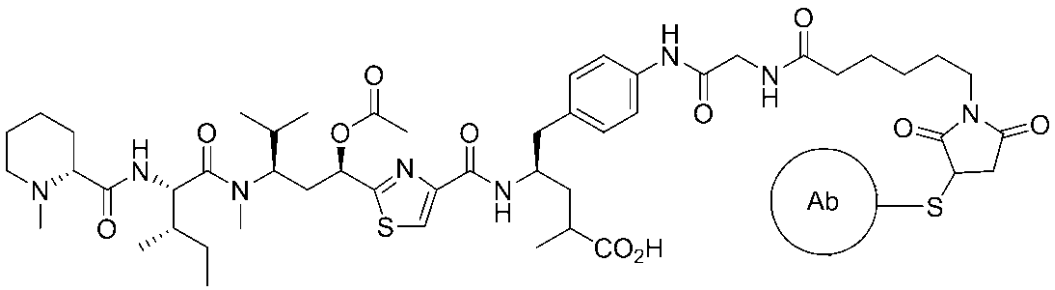
当業者は、上記の条件および方法が例示であって、限定するものではなく、抱合のためのその他の手法も当該技術分野で知られており、本発明で使用可能であることを理解する。

【０１１８】

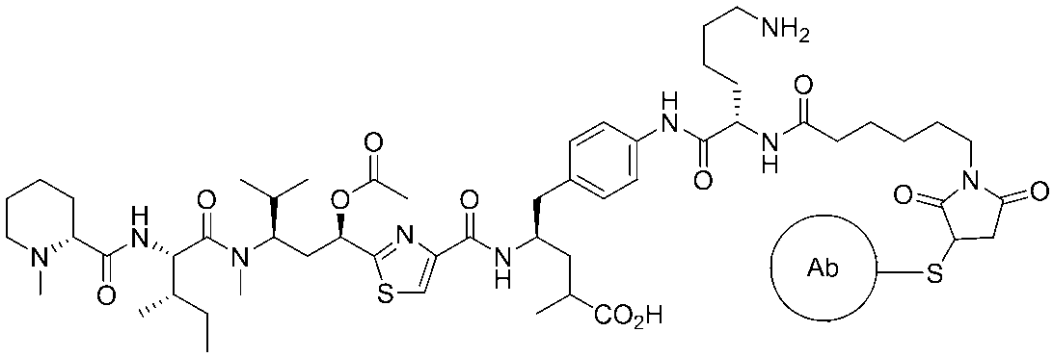
前記の技術を用いて、本発明の化合物は、抗体２Ａ１０、抗ＰＳＭＡ抗体（ＨｕａｎｇらのＵＳ２００９／０２９７４３８）；２Ｈ５、抗ＣＤ７０抗体（ＴｅｒｒｅｔｔらのＵＳ２００９／００２８８７２）；１Ｆ４、抗ＣＤ７０抗体（ＣｏｃｃｉａらのＷＯ２００８／０７４００４）；または６Ａ４、抗メソテリン抗体（ＴｅｒｒｅｔｔらのＷＯ２００９／０４５９５７）を用いて抱合された。生じた抱合体は、Ａｂが抗体を表す下記の式によって描写されうる。当業者であれば、これらの式において、細胞毒素－抗体化合物の比率は、簡潔のために１：１として示されているが、実際には、この比は通常、２から３の

ようにより大きいことを認識するであろう。

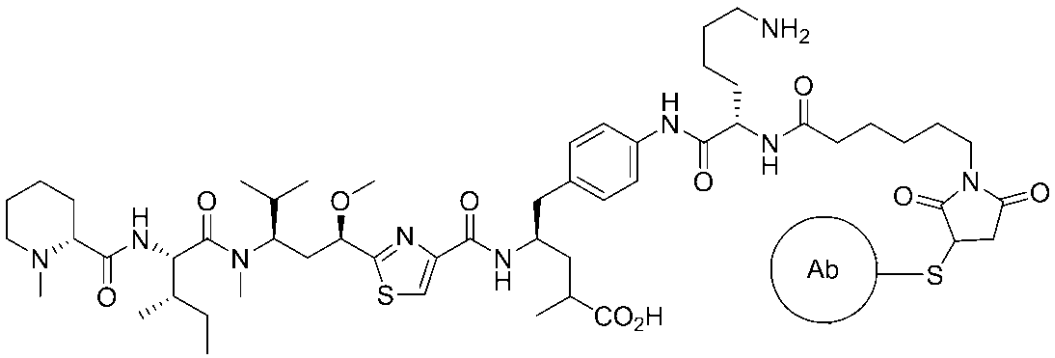
【化７９】



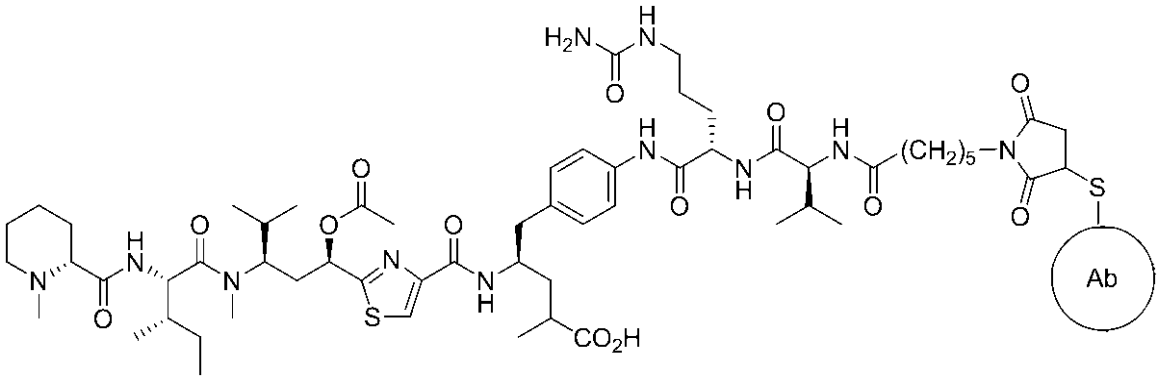
【化８０】



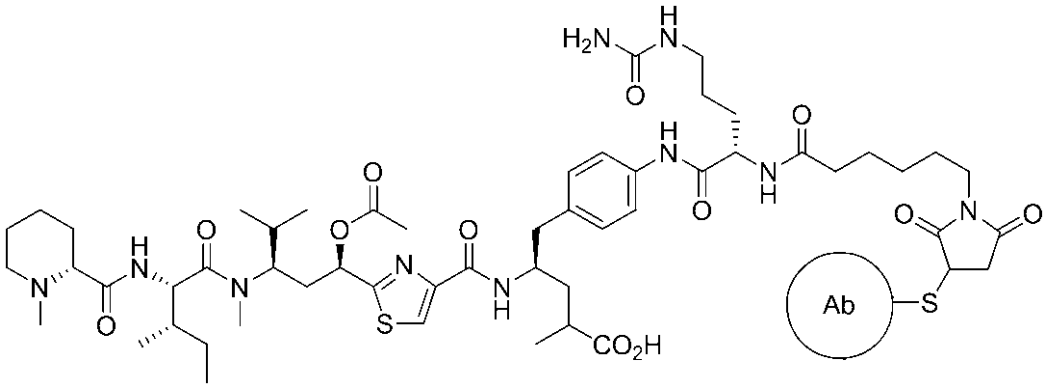
【化８１】



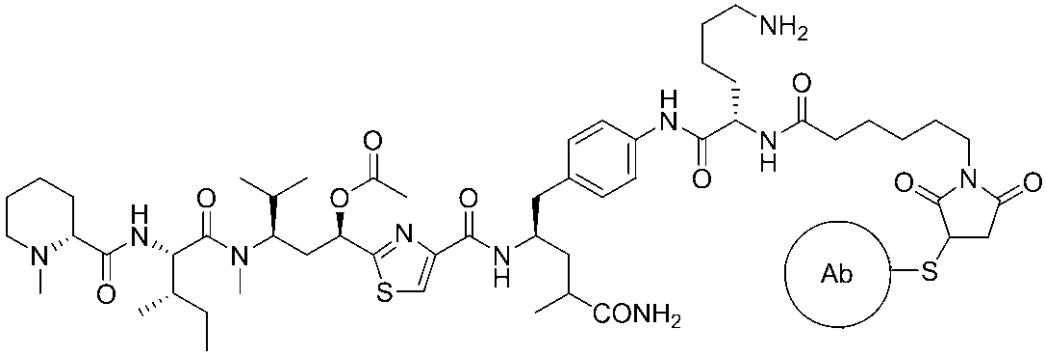
【化８２】



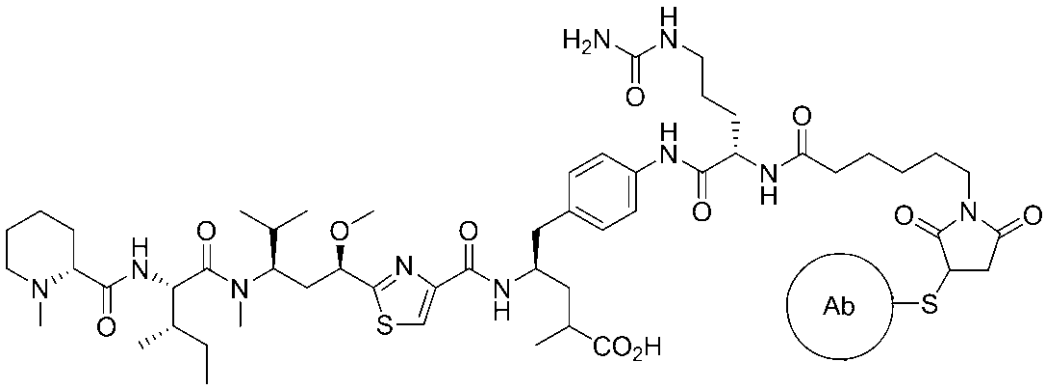
【化８３】



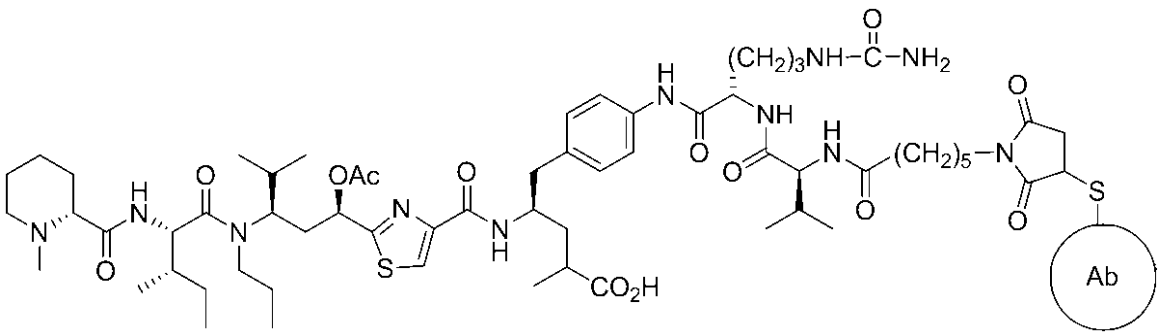
【化８４】



【化８５】



【化８６】



【０１１９】

医薬組成物

他の態様において、本開示は、医薬的に許容される添加剤と共に製剤化された本開示の化合物を含む医薬組成物を提供する。これは所望により、抗体または他の薬物などの１つまたはそれ以上のさらなる医薬的活性成分を含有していてもよい。前記医薬組成物は、他の治療薬、特に他の抗癌薬との併用療法において投与することができる。

【０１２０】

医薬組成物は、１つまたはそれ以上の添加剤を含んでいてもよい。使用することができる添加剤には、担体、界面活性剤、増粘剤または乳濁剤、固体結合剤、分散剤または懸濁助剤、溶解補助剤、着色剤、香味剤、コーティング剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、保存剤、等張化剤およびこれらの組合せが包含される。適切な添加剤の選択および使用は、出典明示により本明細書に取り込まれるGennaro, ed., Remington：The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)に教示されている。

【０１２１】

好ましくは、医薬組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば、注射または点滴による）に適している。投与経路に応じて、活性化合物は、酸の作用およびそれを不活性化させ得るその他の自然条件から保護するための材料でコーティングすることができる。「非経口投与」という語句は、通常、注射による腸内および局所投与以外の投与方法を意味し、これには、以下に限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、クモ膜下、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経皮気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内注射ならびに点滴が包含される。あるいは、医薬組成物は、非経口経路、例えば、投与の局所、表皮または粘膜経路、例えば、鼻腔内、経口、膣、直腸、舌下または局所などを介して投与されうる。

【０１２２】

医薬組成物は、無菌水溶液または分散液の形態であってもよい。それらはまた、マイクロエマルション、リポソームまたは高い薬物濃度を達成するのに適したその他の規則構造中に製剤化されうる。

【０１２３】

担体物質を組み合わせて単一の製剤を製造することができる有効成分の量は、治療される対象および特定の投与方法に応じて変動し、一般に、治療効果を生じる組成物の量である。一般に、１００パーセント以外で、この量は、医薬的に許容される担体と組み合わせて有効成分の約０．０１パーセントから約９９パーセント、好ましくは、有効成分の約０．１パーセントから約７０パーセント、最も好ましくは、約１パーセントから約３０パーセントの範囲である。

【０１２４】

投与計画は、治療効果を生じるように調整される。例えば、単一のボーラスが投与されてもよく、いくつかの分割投薬量が時間をかけて投与されてもよく、あるいは、投薬量がその状況の緊急性に示されるように比例して減少され、もしくは増加されうる。投与を容易にし、投薬を均一にするための投薬単位形態で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。「投薬単位形態」は、治療されるべき対象のための単位投薬量として適した物理的に別個の単位を意味し、各単位は、所望される治療効果を生じるように算出された予め決定された量の活性化合物を、必要とされる医薬担体と共に含有する。

【０１２５】

投薬量は、宿主体重当たり、約０．０００１から１００ｍｇ／ｋｇ、より一般的には０．０１から５ｍｇ／ｋｇの範囲である。例えば、投薬量は、０．３ｍｇ／ｋｇ体重、１ｍｇ／ｋｇ体重、３ｍｇ／ｋｇ体重、５ｍｇ／ｋｇ体重もしくは１０ｍｇ／ｋｇ体重でありうるか、または１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲内でありうる。典型的な治療計画としては、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、１ヶ月に１回、３ヶ月に１回または３～６ヶ月に１回の投与である。好ましい投与計画には、下記の投与スケジュール：（ｉ）４週間ごとに６回の投与、次いで３ヶ月ごと；（ｉｉ）３週間ごと；（ｉｉｉ）３ｍｇ／ｋｇ体重で１回、続いて１ｍｇ／ｋｇ体重で３週間ごとのうちの１つを用いて、静脈内投与による１ｍｇ／ｋｇ体重または３ｍｇ／ｋｇ体重が包含される。ある方法において、投薬量は、約１～１０００μｇ／ｍＬの血漿抗体濃度が達成されるように調節され、ある方法では約２５～３００μｇ／ｍＬである。

【０１２６】

本発明の化合物の「治療上有効量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、疾患症状から開放されている期間の頻度および持続期間の増加、または疾患の苦痛による機能欠

陥もしくは機能障害の予防を生じる。例えば、腫瘍を有する対象の治療においては、「治療上有効量」は、好ましくは、治療されていない対象と比較して、少なくとも約２０％、より好ましくは、少なくとも約４０％、さらにより好ましくは、少なくとも約６０％、なおより好ましくは、少なくとも約８０％まで腫瘍の増殖を阻害する。治療上有効量の治療化合物は、典型的にヒトであるが、別の哺乳動物でありうる対象において、腫瘍サイズを減少させるか、あるいは別段に症状を軽減させることができる。

【０１２７】

医薬組成物は、放出制御または徐放性製剤であり得、これには、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系が包含される。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生物分解可能な生体適合性ポリマーが用いられ得る。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【０１２８】

治療組成物は、出典明示により本明細書に組み込まれる（１）無針皮下注射デバイス（例えば、ＵＳ５，３９９，１６３；５，３８３，８５１；５，３１２，３３５；５，０６４，４１３；４，９４１，８８０；４，７９０，８２４；および４，５９６，５５６）；（２）微小注入ポンプ（ＵＳ４，４８７，６０３）；（３）経皮デバイス（ＵＳ４，４８６，１９４）；（４）点滴装置（ＵＳ４，４４７，２３３および４，４４７，２２４）；および（５）浸透デバイス（ＵＳ４，４３９，１９６および４，４７５，１９６）などの医療機器によって投与されうる。

【０１２９】

ある実施形態において、医薬組成物は、インビボで適正な分布が確かめられるように製剤化することができる。例えば、本発明の治療化合物が血液脳関門を通過したことを確かめるために、それらは、リポソーム中に製剤化され、特定の細胞または臓器への選択的な輸送を高めるための標的部分をさらに含みうる。例えば、ＵＳ４，５２２，８１１；５，３７４，５４８；５，４１６，０１６；および５，３９９，３３１；V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685；Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038；Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140；M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180；Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134；Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090；Keinanen and Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；およびKillion and Fidler (1994) Immunomethods 4:273を参照されたい。

【０１３０】

用途

本発明の化合物またはその抱合体は、以下に限定されないが、頭部、頚部、鼻腔、副鼻腔、上咽頭、口腔、中咽頭、喉頭、下咽頭、唾液腺および傍神経節腫の腫瘍を包含する頭頚部の癌；肝臓および胆樹の癌、特に肝細胞癌腫；腸管癌、特に結腸直腸癌；卵巣癌；小細胞および非小細胞肺癌（ＳＣＬＣおよびＮＳＣＬＣ）；線維肉腫、悪性線維性組織球腫、胎児性横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、神経線維肉腫、骨肉腫、滑膜肉腫、脂肪肉腫および胞状軟部肉腫などの乳癌肉腫；急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）および慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）などの白血病；中枢神経系の腫瘍、特に脳癌；多発性骨髄腫（ＭＭ）、ホジキンリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、Ｂ系列大細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫およびＴ細胞未分化大細胞リンパ腫などのリンパ腫が包含される過剰増殖性疾患などの疾患を治療するために使用することができる。臨床的には、本明細書に記載の方法の実施および組成物の使用は、癌性増殖のサイズもしくは数の減少および／または付随する症状（適用可能な場合には）の低減を生じる。病理学的には、本明細書に記載の方法の実施および組成物の使用は、癌細胞の増殖の阻害、癌または腫瘍のサイズの減少、さらなる腫瘍転移の予防、および腫瘍血管形成の阻害な

どの病理学的に関連する応答を生じる。このような疾患を治療する方法は、治療上有効量の本発明の組み合わせを対象に投与することを特徴とする。前記方法は、必要であれば繰り返されてもよい。特に、癌は、結腸直腸癌、肝臓癌、前立腺癌、乳癌、黒色腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、膵臓癌、卵巣癌、多発性骨髄腫、腎臓癌、白血病（特にＡＬＬ、ＡＰＬまたはＡＭＬ）またはリンパ腫でありうる。

【０１３１】

本発明の化合物またはそれらの抱合体は、抗体、アルキル化薬、血管形成阻害薬、代謝拮抗薬、ＤＮＡ開裂薬、ＤＮＡ架橋剤、ＤＮＡインターカレーター（DNA intercalator）、ＤＮＡ小溝結合薬、エンジイン、熱ショックタンパク質９０阻害薬、ヒストンデアセチラーゼ阻害薬、免疫調節薬、微小管安定化剤、ヌクレオシド（プリンまたはピリミジン）類似体、核外輸送阻害薬、プロテアソーム阻害薬、トポイソメラーゼ（ＩまたはＩＩ）阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬およびセリン／トレオニンキナーゼ阻害薬を含むその他の抗癌薬または細胞毒性薬と組み合わせて投与することができる。具体的な抗癌薬または細胞毒性薬には、β－ラパコン、アンサマイトシンＰ３、オーリスタチン、ビカルタミド、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カリスタチンＡ、カンプトテシン、カペシタビン、ＣＣ－１０６５、シスプラチン、クリプトフィシン、ダウノルビシン、ジソラゾール、ドセタキセル、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、ダイネミシンＡ、エポチロン、エトポシド、フロクスウリジン、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲフィチニブ、ゲルダナマイシン、１７－アリルアミノ－１７－デメトキシゲルダナマイシン（１７－ＡＡＧ）、１７－（２－ジメチルアミノエチル）アミノ１７－デメトキシゲルダナマイシン（１７－ＤＭＡＧ）、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イマチニブ、インターフェロン、インターロイキン、イリノテカン、マイタンシン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、オキサリプラチン、パクリタキセル、スベロイルアニリドヒドロキサム酸（ＳＡＨＡ）、チオテパ、トポテカン、トリコスタチンＡ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、レナリドマイド（ＲＥＶＬＩＭＩＤ（登録商標））、ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標））、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標））およびセツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ（登録商標））が包含される。

【実施例】

【０１３２】

本発明の実施は、下記の実施例を参照してさらに理解することができ、これらは例示のために供されるのであって、限定のためではない。

【０１３３】

実施例１－スキーム１

スキーム１（図１ａおよび１ｂ）は、本化合物の製造方法を示す。

【０１３４】

チオアミド化合物２

２，２－ジエトキシアセトニトリル１（２５ｇ，１９３ｍｍｏｌ）を、３００ｍＬのメタノール（ＭｅＯＨ）中の$(NH_4)_2S$（４０ｍＬ，２６５ｍｍｏｌ，４５％水溶液）と室温（ＲＴ）で混合させた。反応混合液を終夜室温に保った後、減圧濃縮し、残渣を酢酸エチル（ＥｔＯＡｃ）中に溶解させた。ＥｔＯＡｃ溶液を、飽和$NaHCO_3$溶液、続いて食塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させた。ＥｔＯＡｃを蒸発させて、チオアミド化合物２（２６ｇ，１５９ｍｍｏｌ，８２％）を白色の固形物として得た。^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.01 (s, 1H), 3.67 (m, 4H), 1.22 (t, J = 7.2 Hz, 6H).

【０１３５】

２－（ジエトキシメチル）チアゾール－４－カルボン酸メチル３

１００ｇのモレキュラ・シーブス（３Ａ）を、３００ｍＬのＭｅＯＨ中のチオアミド化合物２（２５ｇ，１５３ｍｍｏｌ）およびブロモピルビン酸メチル（２０ｍＬ，１６３ｍｍｏｌ）の反応混合物に加えた。混合物を１．５時間還流させ、冷まし、セライト（登録商標）に通して濾過した。濾液を濃縮し、カラム（ジクロロメタン（ＤＣＭ）：ＥｔＯＡｃ，８：１）に通して、カルボン酸チアゾール化合物３（３４．５ｇ，１４０ｍｍｏｌ，

９１％）を固形物として得て、さらに精製することなく次の工程に用いた。

【０１３６】

２－ホルミルチアゾール－４－カルボン酸メチル４

チアゾール－４－カルボキシレート化合物３（３０ｇ，１２２ｍｍｏｌ）を３００ｍＬのアセトン中に溶解させ、これにＨＣｌ溶液（２１ｍＬ，２Ｍ）を加えた。反応混合物を室温で終夜保ち、次いで反応混合物を加熱し、６０℃で２時間保った。続いて、反応混合液を冷まし、減圧下で蒸発させて、残渣を得て、２００ｍＬのＤＣＭに溶解させた。次いで、ＤＣＭ溶液を飽和$NaHCO_3$溶液、続いて食塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させた。ＤＣＭ溶液を濾過し、減圧濃縮して、濃縮溶液を得て、エーテルによりトリチュレートして、２－ホルミルチアゾール－４－カルボン酸メチル４（１４ｇ，８２ｍｍｏｌ，２工程で５４％）を白色の固形物として得た。^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 133-8-p1 10.16 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H).

【０１３７】

スルフィンイミン化合物７

（Ｓ）－２－メチルプロパン－２－スルフィンアミド５（７．３ｍＬ，６８ｍｍｏｌ）を、１００ｍＬのテトラヒドロフラン（ＴＨＦ）中に溶解させ、これにＴｉ（ＯＥｔ）$_4$（２７ｍＬ，１３０ｍｍｏｌ）および３－メチル－２－ブタノン６（８ｇ，４１ｍｍｏｌ）を室温で加えた。反応混合液を終夜還流し、続いて冷まし、食塩水溶液に加えた。得られた混合液を濾過し、該ケークをＥｔＯＡｃで洗浄した。有機相を濃縮して、残渣を得て、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ＤＣＭ：ＥｔＯＡｃ，４：１）に付して、スルフィンイミン化合物７（９．５ｇ，３７ｍｍｏｌ，７５％）を油状物として得た。^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.53 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.22 (s, 9H), 1.12 (d, J = 4.2 Hz, 3H), 1.10 (d, J = 4.2 Hz, 3H) MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 190.12, 実測値, 190.

【０１３８】

化合物８

リチウムジイソプロピルアミド（「ＬＤＡ」６０ｍＬ，１０８ｍｍｏｌ，１．８Ｍ）を２００ｍＬのエーテルに－７８℃で加え、続いて、２００ｍＬのエーテル中のスルフィンイミン化合物７（１８．９ｇ，１００ｍｍｏｌ）に加え、得られた反応混合物を４０分間攪拌した。ＣｌＴｉ（ＯｉＰｒ）$_3$（２０３ｍｍｏｌ，４８．４ｍＬ）を反応混合液に加え、該溶液を６０分間攪拌した。１８０ｍＬのＴＨＦ中の２－ホルミルチアゾール－４－カルボン酸メチル４（１２．５ｇ，７２．６ｍｍｏｌ）溶液を反応混合液にゆっくり加えた。－７８℃でさらに２時間後、酢酸およびＴＨＦ（１／５ｖ／ｖ，４．９ｍＬ）の混合液を加えた。混合液を１時間にわたり５℃に温め、続いて食塩水溶液中に注ぎ入れた。次いで、所望の生成物を、エーテルおよびＥｔＯＡｃ溶液を用いて食塩水溶液から抽出した。続いて、有機相を無水$MgSO_4$で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を２つのカラム（ＤＣＭ：ＥｔＯＡｃおよびヘキサン：ＥｔＯＡｃ）に通して、化合物８（１９．６ｇ，５４ｍｍｏｌ，７５％）を油状物として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 361.12, 実測値, 361.

【０１３９】

化合物９

２００ｍＬのＴＨＦ中の化合物８（１９ｇ，５２．７ｍｍｏｌ）の溶液を、－７８℃に冷却し、その後、Ｔｉ（ＯＥｔ）$_4$（２１．７ｍＬ，１０５ｍｍｏｌ）をゆっくり加えた。６０分後、溶液が透明になってきたら、$NaBH_4$（３１ｍｍｏｌ，１．１７ｇ）を加え、２時間後（長時間の反応はエステルを減少させた）に１０ｍＬのＭｅＯＨを加えた。次いで、該混合液を０℃に温め、大量の氷中で１ｍＬ　ＨＯＡｃに注ぎ入れた。混合液を濾過し、該ケークをＥｔＯＡｃで洗浄した。分離後、有機相をNa_2SO_4で乾燥させ、蒸発させた。最終残渣をカラム（ＤＣＭ：ＥｔＯＡｃ，１：４）に通して、化合物９（１９ｇ，５２ｍｍｏｌ，９９％）を油状物として得た。^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.1 (s, 1H), 5.54 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 5.16 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.42 ((m, 1H), 3.32

(d, J = 8.4 Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.26 (s, 9H), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (d, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}CNMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 177.9, 162.1, 146.6, 127.7, 67.9, 58.6, 56.4, 52.5, 40.8, 33.9, 23.1, 19.8, 17.4. MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 363.13, 実測値, 363.

【０１４０】

ジメチル化化合物１０

水素化ナトリウム（９．６９ｍｍｏｌ，６０％，３８７ｍｇ）を、５℃で６ｍＬのＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の化合物９の溶液、続いて６０分後にヨウ化メチル（６０７μＬ，９．７ｍｍｏｌ）に加えた。反応混合物を３時間攪拌し、続いて該混合物を氷冷した飽和NH_4Cl溶液に注ぎ入れた。エチルエーテルを加え、有機相を食塩水で洗浄し、無水$MgSO_4$で乾燥させ、濃縮して残渣を得た。残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ　１：４）に通して、ジメチル化化合物１０（３１４ｍｇ，０．８０５ｍｍｏｌ，３３％）を液体として得た。^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17 (s, 1H), 4.87 (dd, J = 11.0 Hz, J = 2.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.40 (m, 1H), 2.58 (s, 3H), 1.99 (m, 1H), 1.83 (m, 2H), 1.25 (s, 9H), 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.7 Hz, 3H) MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 391.16, 実測値, 391.

【０１４１】

モノメチルアミン化合物１１

ＨＣｌ溶液（ジオキサン中で４Ｎ，０．５ｍＬ）を、５ｍＬのＭｅＯＨ中のジメチル化化合物１０（３７０ｍｇ，０．９５ｍｍｏｌ）溶液に加えた。反応混合液を６０分間攪拌し、続いて減圧下で蒸発させて、モノメチルアミン化合物１１（３６２ｍｇ）をそのＨＣｌ塩として得て、さらに精製することなく次の工程に用いた。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 287.14, 実測値, 287.

【０１４２】

アミド化合物１２

モノメチルアミン化合物１１（３６２ｍｇ，１．１２ｍｍｏｌ）、Ｆｍｏｃ化合物２２（Wipf et al., 2007に従って調製した；１．２ｇ，３．３８ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ，９７６μＬ，５．６ｍｍｏｌ）を、５ｍＬのＤＭＦ中で室温にて混合させた。２４時間撹拌後、該混合液を濃縮し、残渣をＥｔＯＡｃ中に溶解させた。有機相を$NaHCO_3$、食塩水で洗浄し、無水$MgSO_4$で乾燥させ、濃縮して残渣を得た。残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｔ：ＭｅＯＨ　７：３：０．６）に通してアミド化合物１２（４６６ｍｇ，０．７５ｍｍｏｌ，６７％）を油状物として得た。(ES+) m/z, 計算値: m+1, 622.2, 実測値, 622.

【０１４３】

化合物１３

アミド化合物１２（４６６ｍｇ，０．７５ｍｍｏｌ）を、５％のピペリジンを含有する８ｍＬのＤＣＭ中に室温で溶解させた。１時間後、該混合物を減圧下で蒸発させ、残渣をカラムに通して油状物（１５０ｍｇ）を得、続いて２ｍＬ　ＤＣＭ中のピペコリン酸（Ｄ）－Ｎ－メチル２３（Peltier et al., 2006に従って調製した「Ｄ－Ｍｅｐ」；５０ｍｇ，０．３５ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）ウロニウム ヘキサフルオロホスフェート（「ＨＡＴＵ」，１２６ｍｇ，０．３３ｍｍｏｌ）、ＤＩＥＡ（１５２μＬ，０．８４ｍｍｏｌ）と混合させた。２．５時間攪拌後、該溶媒を蒸発させて、残渣を得、ＥｔＯＡｃ中に溶解させた。続いて、有機相を飽和$NaHCO_3$、食塩水で洗浄し、無水$MgSO_4$で乾燥させ、濃縮して残渣を得た。残渣をカラム（ＤＣＭ：ＭｅＯＨ　０－１０％）に通して、化合物１３（９９ｍｇ，０．１８８ｍｍｏｌ，２５％）を油状物として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 525.3, 実測値, 525.

【０１４４】

酸化合物１４

化合物１３（９９ｍｇ，０．１８ｍｍｏｌ）を、ＭｅＯＨおよび水（３：１　ｖ：ｖ）

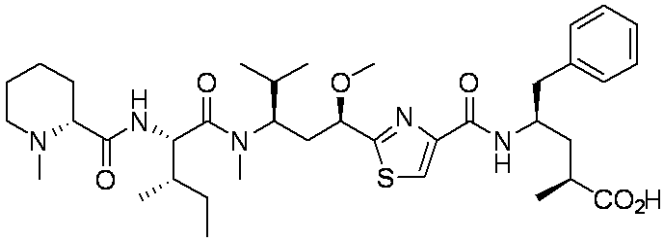
の３ｍＬの混合液中に溶解させ、これにＮａＯＨ（３７０μＬ，０．３７ｍｍｏｌ，１Ｍ）を加えた。２時間撹拌後、反応混合液を中和し、濃縮し、残渣を得た。残渣をＣ－１８カラム（水（１％　トリフルオロ酢酸（「ＴＦＡ」））：アセトニトリル（ＡＣＮ）（１％　ＴＦＡ），０－１００％）に通して、酸化合物１４（７８ｍｇ，０．１２５ｍｍｏｌ，６９％）をＴＦＡ塩として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 511.29, 実測値, 511.

【０１４５】

化合物１５

ＤＩＥＡ（２４μＬ，１３７μｍｏｌ）を、ＤＭＦ（０．５ｍＬ）中の酸化合物１４（９ｍｇ，１４．４μｍｏｌ，ＴＦＡ塩）およびＨＡＴＵ（６ｍｇ，１５μｍｏｌ）の溶液に室温で加えた。全ての酸化合物１４が活性化した（ＨＰＬＣによりモニターした）後、ツブフェニルアラニン（Peltier et al., 2006に従って調製した；６．５ｍｇ，２７μｍｏｌ，ＨＣｌ塩）を加えた。２０分間攪拌後、該反応混合液をＣ－１８カラム（水（１％　ＴＦＡ）：ＡＣＮ（１％　ＴＦＡ），０－１００％）に通して、化合物１５（２．５ｍｇ，３μｍｏｌ，２１％）を白色のＴＦＡ塩として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 700.4, 実測値, 700.

【化８７】



15

【０１４６】

化合物１６

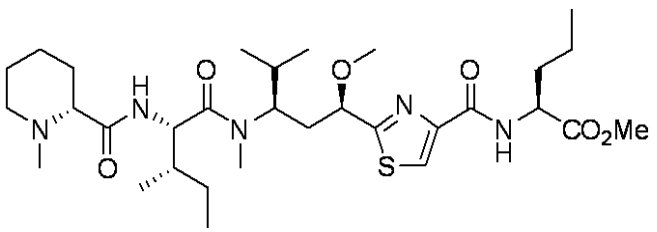
ＤＩＥＡ（２０μＬ，０．１１ｍｍｏｌ）を、０．５ｍＬのＤＭＦ中の酸化合物１４（１２ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ，ＴＦＡ塩）、フェニルアラニンメチルエステル（５．３ｍｇ，０．０２４ｍｍｏｌ，ＨＣｌ塩として）およびＨＡＴＵ（１１．４ｍｇ，０．０３ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。３０分後、反応混合液をＣ－１８カラム（水（１％　ＴＦＡ）：ＡＣＮ（１％　ＴＦＡ）　０－１００％）に通して、化合物１６（４．２ｍｇ，０．００５ｍｍｏｌ，２６％）を白色のＴＦＡ塩として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 672.89, 実測値, 672.5.　化合物１６はまた、上記で化合物（ＩＩＩ－ｃ）とも称される。

【０１４７】

化合物１７

ＤＩＥＡ（７μＬ，０．０４ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ中の酸化合物１４（５ｍｇ、０．００８ｍｍｏｌ）、ノルバリンメチルエステル（「ＮＶａＭ」，２ｍｇ，０．０１２ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（４．５ｍｇ，０．０１２ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。該混合物を３０分間攪拌した後、粗混合物をＣ－１８カラム（水（１％　ＴＦＡ）：ＡＣＮ（１％　ＴＦＡ）　０－１００％）に通して、化合物１７（１．３ｍｇ，０．００１７ｍｍｏｌ，２１％）を白色のＴＦＡ塩として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 624.85, 実測値, 624.5.　化合物１７は上記で化合物（ＩＩＩ－ｅ）とも称される。

【化８８】



17

【０１４８】

酸化合物１８

ＮａＯＨ溶液（７５μＬ，０．７５ｍｍｏｌ，１０Ｍ）を、ＭｅＯＨおよびＴＨＦの混合液中の化合物１６（１６８ｍｇ，０．２５ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。終夜攪拌後、混合液を中和し、凍結乾燥させた。該固形物をさらに精製することなく次の工程に用いた。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 658.36, 実測値, 658.4. 化合物１８は上記で化合物（ＩＩ－ｏ）とも称される。

【０１４９】

ノルバリルアミド化合物１９

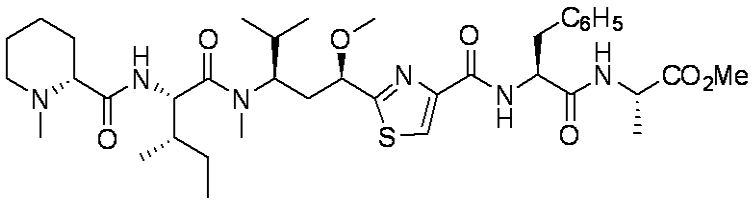
ＤＩＥＡ（５μＬ，０．０３ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ中の酸化合物１８（５ｍｇ，０．００６ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（３．５ｍｇ，０．００９ｍｍｏｌ）およびＮＶａＭ（１．５ｍｇ，０．００９ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。３０分間攪拌後、反応混合液をＣ－１８カラム（水（１％　ＴＦＡ）：ＡＣＮ（１％　ＴＦＡ）　０－１００％）に通して、ノルバリルアミド化合物１９（２．２，０．００２５ｍｍｏｌ，４０％）を白色のＴＦＡ塩として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 772.02, 実測値, 771.5. ノルバリルアミド化合物１９は、上記で化合物（III－ｆ）とも称される。

【０１５０】

化合物２４、２５および２６

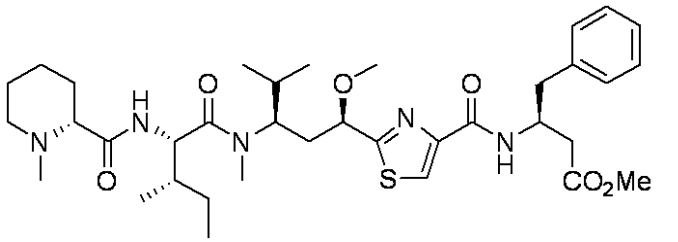
これらの３つの化合物を、上記と同様の手順を用いて、酸化合物１４または１８から合成した。該生成物をＣ－１８カラム（水（１％　ＴＦＡ）：ＡＣＮ（１％　ＴＦＡ）　０－１００％）により全て精製した。収率は２５～５０％で変動した。化合物２４: MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 743.4, 実測値 743. 化合物２５: MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 686.39, 実測値 686.5. 化合物２６: MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 700.40, 実測値 700.5.

【化８９】



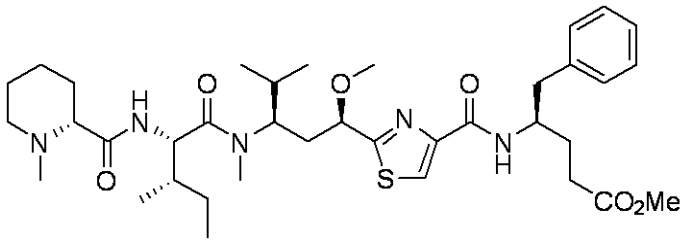
24

【化９０】



25

【化９１】



26

【０１５１】

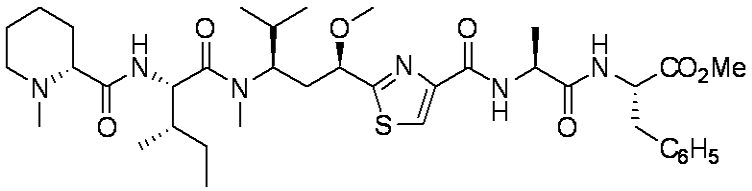
化合物２４は上記で化合物（ＩＩＩ－ｇ）とも称される。

【０１５２】

化合物２６ａ

化合物１４を、化合物１６について記載の同じ手順に従って、Ａｌａ－Ｐｈｅ　ＯＭｅとカップリングさせた。該生成物をＣ－１８カラム（水（１％　ＴＦＡ）：ＡＣＮ（１％　ＴＦＡ），０－１００％）により精製した。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 743, 実測値 743.4. 化合物２６ａは上記で化合物（ＩＩＩ－ｌ）とも称される。

【化９２】



26a

【０１５３】

実施例２－スキーム２

本実施例は、スキーム２（図２）に示される化合物の合成を記載する。

【０１５４】

化合物２８

フェニルアラニンメチルエステル（１０ｍｇ，４６．５μｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（１４．７ｍｇ，３８．６μｍｏｌ）を、０．５ｍＬ　ＤＭＦ中の化合物２７（Peltier et al., 2006に従って調製；１０ｍｇ，１５．５μｍｏｌ，ギ酸塩）の溶液、続いてＤＩＥＡに室温で加えた。３０分間攪拌後、ＤＭＳＯ（２ｍＬ）を加え、反応混合液をＣ－１８カラム（水（５ｍＭ　ギ酸アンモニウム，ｐＨ７．２）：ＡＣＮ　０－１００％）に直接付して、化合物２８（３．２ｍｇ，２５％）を白色の固形物（ギ酸塩）として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 758.41, 実測値 758.4. 化合物２８は上記で化合物（ＩＩＩ－ｈ）とも称される。

【０１５５】

化合物２９

無水酢酸（３０μＬ，２９０μｍｏｌ）を、０．５ｍＬのピリジン中の化合物２８（３．２ｍｇ，３μｍｏｌ，ギ酸塩）の溶液に０℃で加えた。２４時間撹拌した後、溶媒を反応混合液から蒸発させ、残渣を通常のシリカカラム（ＤＣＭ：ＭｅＯＨ　０－１０％）に通して、化合物２９（２．０ｍｇ，８３％）を油状物として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 800.42, 実測値 800.4. 化合物２９は上記で化合物（ＩＩＩ－ｉ）とも称される。

【０１５６】

Ｏ－アセチル，Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ａ

化合物２９（２ｍｇ，２．４μｍｏｌ）を、０．５ｍＬ　ＭｅＯＨ中に溶解させ、これに、ジオキサン中の４Ｎ　ＨＣｌを１滴加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、次いで該混合液を濃縮し、残渣をＤＭＳＯ中に溶解させ、続いてＣ－１８カラム（水（２０ｍＭ　ギ酸アンモニウム，ｐＨ６．１）：ＡＣＮ（０－１００％）に通して、凍結乾燥させてＯ－アセチル，Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ａ（１．３８ｍｇ，７５％）を白色の固形物（ギ酸塩）として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 730, 実測値 730.4. Ｏ－アセチル，Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ａは、上記で化合物（ＩＩＩ－ｍ）とも称される。

【０１５７】

Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ｂ

化合物２８（５ｍｇ，６μｍｏｌ）をＭｅＯＨ中に溶解させ、これにジオキサン中の４Ｎ　ＨＣｌを１滴加えた。該反応液を２４時間撹拌し、次いで該溶液を濃縮し、さらに精製することなく次の工程に用いた。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 687, 実測値 688.4. Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ｂは、上記で化合物（ＩＩＩ－ｎ）とも称される。

【０１５８】

Ｏ－メチル，Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ｃ

Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ｂ（約５ｍｇ，７．２μｍｏｌ）をＤＭＦ中に溶解させ、これに硫酸ジメチル（３μＬ，３７μｍｏｌ）およびＮａＨ（２ｍｇ，５０μｍｏｌ，

鉱油中で６０％）を０℃で加えた。１時間後、該混合液をＤＭＳＯ中に溶解させ、Ｃ－１８カラム（水（２０ｍＭ　ギ酸アンモニウム，ｐＨ６．１）：ＡＣＮ（０－１００％））に通して、Ｏ－メチル，Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ｃを半固形物（０．３１ｍｇ，５％；同じＭＷの同定されていない化合物を含有する混合物）として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 702, 実測値 702.4.　Ｏ－メチル，Ｎ，Ｏ－アセタール化合物２９ｃは、上記で化合物（ＩＩＩ－ｋ）とも称される。

【０１５９】

実施例３－スキーム３

スキーム３（図３）は、式（ＩＩ－ｂ）に記載の化合物を調製するための手順を示す。

【０１６０】

アルコール化合物３０

ＴＦＡ（１７１ｍＬ）を、ＤＣＭ（２７２ｍＬ）中の（Ｓ）－ｔｅｒｔ－ブチル－１－ヒドロキシ－３－（４－ニトロフェニル）プロパン－２－イルカルバメート２０（Erlansonらの米国特許第７，２１４，４８７　Ｂ２号；１３．９ｇ，４６．９ｍｍｏｌ）溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温に温め、反応を２５分間進行させた。該溶液を濃縮して、９．２ｇの粗（Ｓ）－２－アミノ－３－（４－ニトロフェニル）プロパン－１－オールを白色の固形物として得た。ＴＨＦ（８７ｍＬ）および水（８７ｍＬ）中のこの粗生成物および炭酸ナトリウム（１２．４ｇ，１１７．３ｍｍｏｌ）の溶液に、Ｎ－カルボエトキシフタルイミド（「ＣＥＰＴ」，１２．３ｇ，５６．３ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で４時間撹拌し、ＥｔＯＡｃ（１５０ｍＬ）を加えた。水相をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、食塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して粗残渣を得、ヘキサン中で０－１００％　ＥｔＯＡｃのグラジエントでシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーで精製して、１２．３ｇのアルコール化合物３０を得た。MS: (+) m/z 327.0 (M+1).

【０１６１】

トリフレート化合物３１

無水ＤＣＭ（１８ｍＬ）中のアルコール化合物３０（１ｇ，３．０６ｍｍｏｌ）溶液に、ピリジン（０．２７４ｍＬ，３．３６ｍｍｏｌ）を－７８℃で加えた。該反応混合物を－７８℃で５分間攪拌し、次いでトリフルオロメタンスルホン酸無水物（０．５６８ｍＬ，３．３６ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を－７８℃で４５分間撹拌し、続いて室温で４５分間攪拌した。沈殿物を濾過して除き、濾液を、ＤＣＭでシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．８４ｇのトリフレート化合物３１を得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.81 (2H, m), p7.74 (2H, m), 7.36 (2H, J = 8.8 Hz), 5.13 (1H, t, J = 10.0 Hz), 4.99 (1H, m), 4.80 (1H, dd, J = 4.8, 5.6 Hz), 3.52 (1H, dd, J = 3.2, 11.2 Hz), および 3.27 (1H, dd, J = 5.6, 8.8 Hz).

【０１６２】

ジエステル化合物３２

ジエチルメチルマロネート（０．７１ｍＬ，４．１２ｍｍｏｌ）を、無水ＴＨＦ（４．７ｍＬ）中の水素化ナトリウム（０．１６１ｇ，鉱油中で６０％の分散液，４．０３ｍｍｏｌ）懸濁液に０℃で滴下して加えた。反応混合液を０℃で１０分間攪拌し、続いて室温で１０分間攪拌した。生じた溶液を、無水ＴＨＦ（９．４ｍＬ）中のトリフレート化合物３１（０．８４ｇ，１．８３ｍｍｏｌ）溶液に０℃でゆっくり加えた。反応混合液を０℃で終夜攪拌した後、飽和NH_4Cl水溶液（２０ｍＬ）を加えた。該水溶液をＥｔＯＡｃで抽出し、有機相を合わせて、食塩水で洗浄し、$MgSO_4$で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して残渣を得た。粗生成物を、ヘキサン中で０～５０％　ＥｔＯＡｃのグラジエントでシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．５７ｇのジエステル化合物３２を得た。MS: (+) m/z 483.3 (M+1).

【０１６３】

モノエステル化合物３３

６Ｎ　ＨＣｌ（１０ｍＬ）および酢酸（１０ｍＬ）中のジエステル化合物３２の溶液を１４５℃で２日間加熱した。該有機溶液を濃縮して、０．４１ｇの粗（Ｒ）－４－アミノ－２－メチル－５－（４－ニトロフェニル）ペンタン酸の塩酸塩を白色の固形物として得た。

【０１６４】

２，２－ジメトキシプロパン（「ＤＭＰ」，４ｍＬ，３２．６ｍｍｏｌ）を、無水ＭｅＯＨ（２０ｍＬ）中の粗生成物の塩酸塩および濃ＨＣｌ（１ｍＬ）の溶液に加えた。該反応混合液を６０℃で終夜加熱した。有機溶液を濃縮して、０．４３ｇの粗（Ｒ）－メチル　４－アミノ－２－メチル－５－（４－ニトロフェニル）ペンタノエートの塩酸塩を白色の固形物として得た。

【０１６５】

トリエチルアミン（０．４４ｍＬ，３．１ｍｍｏｌ）を、ＡＣＮ（１０ｍＬ）中の粗（Ｒ）－メチル　４－アミノ－２－メチル－５－（４－ニトロフェニル）ペンタノエートの塩酸塩および二炭酸－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（０．３６９ｇ，１．６９ｍｍｏｌ）の溶液に室温で加えた。反応混合液を室温で４時間撹拌し、次いで該溶媒を蒸発させた。水（２０ｍＬ）を加え、水溶液をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、食塩水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中で０－３０％　ＥｔＯＡｃのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーで精製して、０．３１ｇのモノエステル化合物３３を無色の油状物として得た。MS: (+) m/z 267.3 (M-99).

【０１６６】

カルボン酸化合物３４

６Ｎ　ＨＣｌ中のモノエステル化合物３３（０．３１ｇ，０．８４６ｍｍｏｌ）溶液を１３０℃で１．５時間加熱した。有機溶液を濃縮して、０．２４４ｇのカルボン酸化合物３４を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 253.1 (M+1).

【０１６７】

ニトロ酸化合物３５

化合物３４ａ（８０．４ｍｇ，０．１４９ｍｍｏｌ，Patterson et al., 2008に従って調製した）を、ＤＣＭ（０．７６ｍＬ）中のペンタフルオロフェノール（４１．１ｍｇ，０．２２４ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（「ＤＩＣ」，０．０２５５ｍＬ，０．１６４ｍｍｏｌ）の０．２Ｍ溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温に温め、室温で終夜攪拌した。該溶媒を蒸発させた。ＥｔＯＡｃ（１８ｍＬ）を加え、ＥｔＯＡｃで反応管をすすぎながら粗生成物を濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、粗物質をさらに精製することなく用いた。ＤＭＦ（０．６ｍＬ）を、粗生成物、続いて、カルボン酸化合物３４（０．１２９ｇ，０．４４８ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．１３ｍＬ，０．７４５ｍｍｏｌ）に加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、溶媒を蒸発させて除去した。粗生成物を、１％　NH_4OHを含有するＤＣＭ中で１０－２０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．１１ｇのニトロ酸化合物３５を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 773.4 (M+1).

【０１６８】

アミノ酸化合物３６

ＭｅＯＨ（５ｍＬ）中のニトロ酸化合物３５（０．１１ｇ，０．１４２ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，１５ｍｇ）溶液を、水素雰囲気下で４時間攪拌した。該触媒を濾過して除去し、濾液を濃縮して、９１ｍｇのアミノ酸化合物３６を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 743.5 (M+1). アミノ酸化合物３６は上記で化合物（ＩＩＩ－ｂ）とも称される。

【０１６９】

メチルエステル化合物３６ａ

ＨＣｌ（１滴，３７％）を、ＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）中のアミノ酸化合物３６（１．９

ｍｇ，２．５ｍｍｏｌ）および２，２－ジメトキシプロパン（「ＤＭＰ」，０．０５ｍＬ，０．４１ｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で２時間撹拌し、続いて濃縮した。粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣにより精製して、１．７ｍｇのメチルエステル化合物３６ａを白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 757.5 (M+1). エステル化合物３６ａは、式（ＩＩＩ－ｔ）としても本明細書で示される。

【０１７０】

実施例４－スキーム４

スキーム４（図４）は、抱合用に準備されたペプチジルリンカーおよび反応性官能基を本化合物に結合させるための方法を示す。

【０１７１】

化合物３７

ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中のＤＩＥＡ、Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－ＯＨ（１７．３ｍｇ，０．０３７ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（１２．８ｍｇ，０．０３３６ｍｍｏｌ）の溶液を室温で５分間撹拌した。溶液のｐＨは８～９の間に保った。次いで、ＤＭＦ（２ｍＬ）およびＤＩＥＡ中のアミノ酸化合物３６（２５ｍｇ，０．０３３６ｍｍｏｌ）の溶液を、ｐＨを８～９の間に保ちながら反応混合液に加えた。室温で１５分間撹拌し、次いで飽和NH_4Cl溶液（５ｍＬ）を加えて反応をクエンチした。水溶液をＥｔＯＡｃで抽出し、有機相を合わせて、乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭ中で０－２０％ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーで精製して、３６．１ｍｇの化合物３７を得た。MS: (+) m/z 1193.6 (M+1).

【０１７２】

化合物３８

ピペリジンを、ＤＭＦ（２ｍＬ）中の化合物３７（３６．１ｍｇ，０．０３０２ｍｍｏｌ）の溶液に、ｐＨを９から１０の間に保ちながら加えた。室温で２０分間撹拌し、次いで有機溶液を濃縮して２９．３ｍｇの粗遊離α－アミノ化合物を得た。

【０１７３】

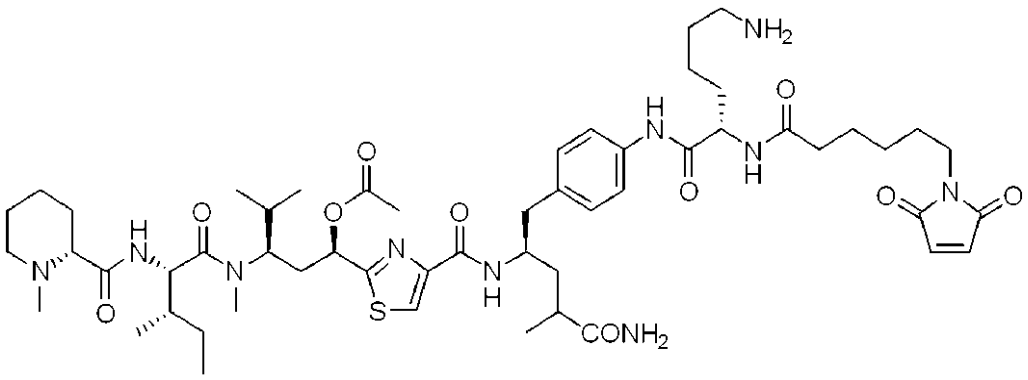
ＤＩＥＡを、ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中の６－マレイミドヘキサン酸（７．０ｍｇ，０．０３３２ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（１１．５ｍｇ，０．０３０２ｍｍｏｌ）溶液に、ｐＨを８から９の間に保ちながら加えた。反応混合液を室温で５分間撹拌した。次いで、ＤＭＦ（２ｍＬ）中のＤＩＥＡおよび粗遊離アミノ化合物を、ｐＨを８および９の間に保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間撹拌し、次いで粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣにより精製して、９．１ｍｇの化合物３８を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 1164.6 (M+1).

【０１７４】

化合物３９

ＴＦＡ（１．５ｍＬ）を、ＤＣＭ（１．５ｍＬ）中の化合物３８（９．１ｍｇ，０．００７８ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。該反応混合液を室温で１５分間撹拌し、次いで粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣにより精製して、５．０ｍｇの所望化合物３９のＴＦＡ塩を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 1064.8 (M+1). 化合物３９の遊離塩基構造は、上記で化合物（ＶＩ－ｂ）としても示される。化合物３９のいくつかのアミド化合物もまた、その製造過程の副産物として単離した。MS: (+) m/z 1063.6 (M+1). 該アミド化合物は、式（ＶＩ－ｑ）としても本明細書にて示される。

【化９３】



化合物39のアミド

【０１７５】
実施例５－スキーム５
スキーム５（図５）は、式（ＩＩ－ｂ）に記載の化合物を調製するための別の手順を示す。
【０１７６】
アミノエステル化合物４２
１，４－ジオキサン（６．７ｍＬ）中の４．０Ｎ　ＨＣｌを、エタノール（１７ｍＬ）中の化合物４１（Patterson et al., 2008に従って調製した；１ｇ，２．６６ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で２時間攪拌し、次いで濃縮して０．８２ｇのアミノエステル化合物４２を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 273.3 (M+1).
【０１７７】
アジドエステル化合物４３
塩化オキサリル（１．７１ｍＬ，１９．９５ｍｍｏｌ）およびＤＭＦ（０．３３ｍＬ，４．２６ｍｍｏｌ）を、ヘキサン（１７６ｍＬ）中のアジドイソロイシン（Lundquist et al., Org.Lett. 2001, 3, 781；０．６６９ｇ，４．２６ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で１時間攪拌し、濾過し、濃縮して、酸塩化物を得た。酸塩化物およびＤＩＥＡ（２．３２ｍＬ，１３．３ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（２６．７ｍＬ）中のアミノエステル化合物４２（０．８２ｇ，２．６６ｍｍｏｌ）の溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温に温め、室温で終夜攪拌した。食塩水を加えて反応をクエンチし、水溶液をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中で０－５０％　ＥｔＯＡのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．８６ｇのアジドエステル化合物４３を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 412.3 (M+1).
【０１７８】
トリエチルシリル化合物４４
２，６－ルチジン（１．２２ｍＬ，１０．４５ｍｍｏｌ）およびトリエチルシリルトリフルオロメタンスルホネート（１．１４ｍＬ，５．０２ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（１１ｍＬ）中のアジドエステル化合物４３（０．８６ｇ，２．０９ｍｍｏｌ）の溶液に０℃で加えた。反応混合液を１時間にわたり室温に温め、続いて室温でさらに１時間攪拌した。食塩水を加えて反応をクエンチし、水溶液をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中で０－３０％　ＥｔＯＡｃのグラジエントを用いて溶出するシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、１．１ｇのトリエチルシリル化合物４４を得た。MS: (+) m/z 526.4 (M+1).
【０１７９】
Ｎ－メチル化合物４５
ＴＨＦ（６．５ｍＬ）中のトリエチルシリル化合物４４（１．０４ｇ，１．９８ｍｍｏｌ）溶液を－４５℃に冷却し、ヘキサメチルジシラジドカリウム（トルエン中で０．５Ｍ

，４．７５ｍＬ，２．３７ｍｍｏｌ）を加えた。生じた混合物を－４５℃で２０分間撹拌した。ヨウ化メチル（０．３７ｍＬ，５．９４ｍｍｏｌ）を加え、反応混合液を４時間にわたり室温に温め、その後、反応をエタノール（１０ｍＬ）でクエンチした。粗生成物をＥｔＯＡｃで希釈し、食塩水で洗浄し、水相をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中で０－３０％　ＥｔＯＡｃのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．９１ｇのＮ－メチル化合物４５を得た。MS: (+) m/z 540.4 (M+1).

【０１８０】

化合物４６

脱酸素化したＡｃＯＨ／H_2O／ＴＨＦ（６５ｍＬ，３：１：１，ｖ／ｖ／ｖ）中のＮ－メチル化合物４５（１．０ｇ，１．８５ｍｍｏｌ）溶液を室温で３６時間撹拌した。トルエン（２５０ｍＬ）を加え、溶液を濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中で０－１００％　ＥｔＯＡｃのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．４６ｇの化合物４６を油状物として得た。MS: (+) m/z 426.3 (M+1).

【０１８１】

メチルエーテル化合物４７

ヘキサメチルジシラジドカリウム（「ＫＨＭＤＳ」，トルエン中で０．５Ｍ，２．５４ｍＬ，１．２７ｍｍｏｌ）を、ＴＨＦ（５ｍＬ）中の化合物４６（０．４５ｇ，１．０６ｍｍｏｌ）の溶液に－７８℃で加えた。反応混合液を－７８℃で２０分間撹拌した。ヨウ化メチル（０．２ｍＬ，３．１８ｍｍｏｌ）を加え、反応混合液を２時間にわたり－２０℃に温め、その後、飽和NH_4Cl溶液で反応をクエンチした。水溶液をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中の０－５０％　ＥｔＯＡｃのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．４１ｇの化合物４７を無色の油状物として得た。 MS: (+) m/z 440.3 (M+1).

【０１８２】

化合物４８

ＥｔＯＡｃ（１０ｍＬ）中のＤ－Ｍｅｐ（０．４５ｇ，３．１４ｍｍｏｌ）の溶液に、ペンタフルオロフェノール（０．６４ｇ，３．４７ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（「ＤＣＣ」，０．７２ｇ，３．４７ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で終夜撹拌し、次いで沈殿物を濾過し、ＥｔＯＡｃで洗浄した。得られた濾液に、化合物４７（０．４６ｇ，１．０５ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０重量％，０．３６ｇ）を加えた。反応混合液を水素雰囲気下で終夜撹拌した。触媒を濾過して除き、続いて濾液を減圧下で濃縮した。粗生成物を、ＥｔＯＡｃ中で０－５％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．４３ｇの化合物４８を無色の油状物として得た。MS: (+) m/z 539.4 (M+1).

【０１８３】

カルボン酸化合物４９

脱酸素化した１，４－ジオキサン（８ｍＬ）中の化合物４８（０．４３ｇ，０．８０ｍｍｏｌ）の溶液に、脱酸素化した水酸化リチウム水溶液（０．６Ｍ，４ｍＬ）を室温で加えた。反応混合液を室温で２時間撹拌し、次いで減圧下で濃縮した。粗生成物を、１％NH_4OHを含有するＤＣＭ中で１０－３０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．３ｇのカルボン酸化合物４９を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 511.4 (M+1).

【０１８４】

ニトロ酸化合物５０

カルボン酸化合物４９（８０ｍｇ，０．１５７ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（０．８ｍＬ）中のペンタフルオロフェノール（４３．３ｍｇ，０．２３５ｍｍｏｌ）およびＤＩＣ（０．

０２６９ｍＬ，０．１７３ｍｍｏｌ）の０．２Ｍ溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温に温め、かかる温度で終夜攪拌した。溶媒を蒸発させた。酢酸エチル（１８ｍＬ）を加え、反応管をＥｔＯＡｃですすぎながら、粗生成物を濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、粗物質をさらに精製することなく用いた。ＤＭＦ（０．６ｍＬ）を粗生成物に加え、、続いてカルボン酸化合物３４（０．１３６ｇ，０．４７ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．１３７ｍＬ，０．７８５ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、続いて溶媒を減圧下で蒸発させた。粗生成物を、１％　NH_4OHを含有するＤＣＭ中で１０－２０％ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．１ｇのニトロ酸化合物５０を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 745.4 (M+1).

【０１８５】

アミノ酸化合物５１

ＭｅＯＨ（５ｍＬ）中のニトロ酸化合物５０（０．１ｇ，０．１３４ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，１４ｍｇ）の混合物を、水素雰囲気下で４時間攪拌した。触媒を濾過して除き、濾液を減圧下で濃縮して、８７．３ｍｇのアミノ酸化合物５１を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 715.5 (M+1).アミノ酸化合物５１は、上記で化合物（ＩＩ－ｊ）とも称される。

【０１８６】

実施例６－スキーム６

スキーム６（図６）は、式（ＩＩ－ｂ）に記載の化合物を調製するためのさらなる別の手順を示す。

【０１８７】

ヒドロキシニトロ化合物５２

化合物２７（スキーム２）（１６．４ｍｇ，０．０２７５ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（０．２ｍＬ）中のペンタフルオロフェノール（７．６ｍｇ，０．０４１３ｍｍｏｌ）およびＤＩＣ（０．００９４ｍＬ，０．０６０６ｍｍｏｌ）の０．２Ｍ溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温に温め、室温で終夜攪拌した。溶媒を蒸発させた。ＥｔＯＡｃ（３ｍＬ）を加え、反応管をＥｔＯＡｃですすぎながら粗生成物を濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、粗物質をさらに精製することなく用いた。ＤＭＦ（０．１ｍＬ）を粗生成物に加え、続いて、カルボン酸化合物３４（スキーム３）（２０．８ｍｇ，０．０８３ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．０２４ｍＬ，０．１３８ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、次いで溶媒を蒸発させた。粗生成物を、ＤＣＭ中で０－１０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーで精製して、１４．９ｍｇのヒドロキシニトロ化合物５２を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 831.5 (M+1).

【０１８８】

アセチルニトロ化合物５３

ピリジン（０．２３ｍＬ）中のヒドロキシニトロ化合物５２（１４．９ｍｇ，０．０１８ｍｍｏｌ）の０．１Ｍ溶液を０℃に冷却し、無水酢酸（０．０５４ｍＬ，０．５７ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を２時間にわたり室温に温め、室温で２４時間攪拌した。反応混合液を０℃に冷却し、１，４－ジオキサンおよび水の１：１混合液を加えた。反応混合液を室温に温め、続いてこの温度で１２時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、２．２ｍｇのアセチルニトロ化合物５３を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 873.2 (M+1).

【０１８９】

アセチルアミノ化合物５４

メタノール（０．２ｍＬ）中のアセチルニトロ化合物５３（２．２ｍｇ，０．００２５ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，１ｍｇ）の混合物を、水素雰囲気下で４時間攪拌した。触媒を濾過して除去し、濾液を濃縮した。粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、０．１ｍｇのアセチルニトロ化合物５４を白色の固形物として得た。MS: (+

) m/z 843.2 (M+1).アセチルアミノ化合物５４は、上記で化合物（ＩＩＩ－ａ）とも称される。

【０１９０】

実施例７－スキーム７

スキーム７（図７）は、本化合物を調製するためのさらなる別の手順を示す。

【０１９１】

化合物５５

化合物３４ａ（スキーム３）（７０ｍｇ，０．１３ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（０．６６ｍＬ）中のペンタフルオロフェノール（３５．９ｍｇ，０．１９５ｍｍｏｌ）およびＤＩＣ（０．０２２３ｍＬ，０．１４３ｍｍｏｌ）の０．２Ｍ溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温で温め、室温で終夜攪拌した。溶媒を蒸発させた。ＥｔＯＡｃ（１６ｍＬ）を加え、反応管をＥｔＯＡｃですすぎながら粗生成物を濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、粗物質をさらに精製することなく用いた。ＤＭＦ（０．５ｍＬ）を粗生成物に加え、続いてｐ－ニトロフェニルアラニン（８２．０ｍｇ，０．３９ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．１１４ｍＬ，０．６５ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、次いで溶媒を蒸発させた。粗生成物を、１％　NH_4OHを含有するＤＣＭ中で１０－２０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、６５．２ｍｇの化合物５５を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 731.0 (M+1).

【０１９２】

化合物５６

ＭｅＯＨ（３ｍＬ）中の化合物５５（６５．２ｍｇ，０．０８９ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，９．４ｍｇ）の混合液を水素雰囲気下で４時間攪拌した。触媒を濾過して除き、濾液を濃縮して、３３．８ｍｇの化合物５６を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 701.2 (M+1).化合物５６は、上記で化合物（ＩＩＩ－ｄ）とも称される。

【０１９３】

実施例８－スキーム８

スキーム８（図８ａ）は、本化合物を調製するための中間体として有用な式（ｖＩＩＩ－ｂ）に記載の化合物を調製するための方法を示す。

【０１９４】

Ｂｏｃエステル化合物５８

ＤＭＦ（Ａｃｒｏｓ，無水，５０ｍＬ）中のアミノエステル化合物５７（Ｃｈｅｍ－Ｉｍｐｅｘ，５ｇ，１９．１８ｍｍｏｌ）および二炭酸－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（「$(Boc)_2O$」，Ａｌｄｒｉｃｈ，４．６ｇ，２１．１０ｍｍｏｌ）の溶液に、トリエチルアミン（「ＴＥＡ」，Ａｌｄｒｉｃｈ，８．３６ｍＬ，６０ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を０．５時間撹拌した。ＨＰＬＣ分析により反応の完了が示された。反応混合液をＥｔＯＡｃ（５００ｍＬ）で希釈し、有機相を水（２００ｍＬ）、続いて食塩水（２００ｍＬ）で洗浄し、無水$MgSO_4$で乾燥させ、濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭ中の０－５％ＭｅＯＨを用いて１２０ｇのＣｏｍｂｉＦｌａｓｈカラムで精製して、白色の固形物としてＢｏｃエステル化合物５８（５．６ｇ，８１％）を得た。^{1}HNMR (DMSO) δ 8.18 (d, 2 H), 7.47 (d, 2 H), 7.38 (d, 1H), 4.23 (m, 1 H), 3.60 (s, 3 H), 3.15 (m, 1 H), 2.95 (m, 1 H), 1.23 (s, 9 H).

【０１９５】

アルケン化合物５９

ドライアイスアセトン中で－７８℃に冷却したＤＣＭ（Ａｃｒｏｓ，無水，２ｍＬ）中のＢｏｃエステル化合物５８（２３０ｍｇ，０．６８ｍｍｏｌ）の溶液に、ＤＩＢＡＬ（Ａｌｄｒｉｃｈ，ＤＣＭ中で１Ｍ，１ｍＬ）をゆっくり加えた。反応混合液を攪拌し、３時間にわたり－２０℃に温めた。（１－エトキシカルボニルエチリデン）－トリフェニルホスホラン（Ａｌｄｒｉｃｈ，４９２ｍｇ，１．３６ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を－２０℃で１時間攪拌した。反応混合液をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で希釈し、得られた

有機相を水（５０ｍＬ）、続いて食塩水（５０ｍＬ）で洗浄し、無水$MgSO_4$で乾燥させ、濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中の０－５０％　ＥｔＯＡｃを用いて１０ｇのＣＯＭＢＩＦＬＡＳＨ（登録商標）カラムで精製して、白色の固形物としてアルケン化合物５９（１５１ｍｇ，５９％）を得た。^{1}HNMR (DMSO) δ 8.18 (d, 2 H), 7.47 (d, 2 H), 7.22 (d, 1H), 6.51 (d, 1 H), 4.48 (m, 1 H), 4.11 (q, 2 H), 2.80-2.94 (m, 2 H), 1.62 (s, 3 H), 1.23 (s, 9 H), 1.16 (t, 3 H).

【０１９６】

アリールアミン化合物６０

ＥｔＯＨ（Ａｃｒｏｓ，無水，３ｍＬ）中のアルケン化合物５９（１４８ｍｇ，０．３９ｍｍｏｌ）および炭上のＰｄ（Ａｌｄｒｉｃｈ，１０％，５０ｍｇ）の溶液をH_2下で終夜攪拌した。反応混合液をＤＣＭ（１０ｍＬ）で希釈し、セライト（登録商標）に通して濾過した。濾液を濃縮し、粗生成物を、ＤＣＭ中で０－２０％　ＭｅＯＨを用いて４ｇのＣＯＭＢＩＦＬＡＳＨ（登録商標）カラムで精製して、アリールアミン化合物６０を白色の固形物（１０２ｍｇ，７５％）として得た。^{1}HNMR (DMSO) δ 7.18 (d, 2 H), 7.11 (s, 2 H), 6.71 (d, 1 H), 3.98 (q, 2 H), 3.51 (m, 1 H), 2.57 (m, 2 H), 2.41 (m, 1 H), 1.63 (m, 1 H), 1.37 (m, 1 H), 1.29 (s, 9 H), 1.09 (t, 3 H), 0.99 (d, 3 H), MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 351.2, 実測値 351.2.

【０１９７】

実施例９－スキーム９

スキーム９（図８ｂ）は、本化合物を調製するための中間体として有用な式（ＶＩＩＩ－ｂ）に記載の化合物を調製するための別の方法を示す。

【０１９８】

アミノ酸化合物６１

ＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）中のカルボン酸化合物２４（スキーム３，図３）（４．４ｍｇ，０．００２５ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，１ｍｇ）の混合物を、水素雰囲気下で終夜攪拌した。触媒を濾過して除き、濾液を濃縮して、３．５ｍｇのアミノ酸化合物６１を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 223.3 (M+1).

【０１９９】

実施例１０－スキーム１０、１１および１２

スキーム１０（図８ｃ）は、本化合物を調製するための中間体として有用な式（ＶＩＩＩ－ｂ）に記載の化合物を調製するための別の方法を示す。

【０２００】

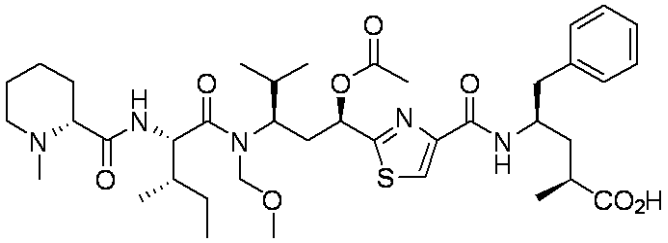
化合物６２

メタノール（２０ｍＬ）中のモノエステル化合物３３（スキーム３，図３）（０．３４ｇ，０．９３ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，５０ｍｇ）の混合物を、水素雰囲気下で終夜攪拌した。触媒を濾過して除き、濾液を濃縮して、０．２９ｇの化合物６２を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 237.3 (Bocなし).

【０２０１】

スキーム１１（図９）は、式（ＶＩＩＩ－ｂ）に記載の化合物が本化合物を調製するために用いることができる方法を図示する。Ｂｏｃエステル化合物６２は、最初に芳香族アミン基をＦｍｏｃ基で保護し、ＴＦＡで処理することで脂肪族アミン基からＢｏｃ基を取り除き、カルボン酸α，α－ジメチル－ｐ－フェニルベンジルフェニルエステル（８Ｃｌ）で処理して、そこにＢｐｏｃ基を導入し、次いでＦｍｏｃ基をピペリジンで取り除くことによって、Ｂｐｏｃエステル化合物６２ａに変換される。Ｂｐｏｃエステル化合物６２ａは、ＨＡＴＵを用いてカルボン酸化合物とカップリングされて中間体エステル化合物を生じ、次いでＬｉＯＨで加水分解されて化合物６４を生じる。水素化により化合物６４からＣｂｚ保護基を取り除き、６－マレイミドヘキサン酸を用いてＨＡＴＵによりカップリングさせ、Ｂｐｏｃ基を酢酸で取り除き、アミノ酸化合物６５を得た。化合物３４ａを用いたＨＡＴＵによるカップリング（スキーム３，図３）により化合物６６を得た。Ｂｏｃ保護基をＴＦＡで取り除いて、抱合のために用いられる化合物６７を得た。

【０２０２】
式（ＶＩＩＩ－ｂ）の化合物を利用するさらなる別の態様がスキーム１２（図１０）に示されている。化合物３４ａを出発物質とし、化合物６８を用いてＨＡＴＵによりカップリングさせてＢｏｃエステル化合物６９を得る。Ｂｏｃ基をＴＦＡで取り除き、エステル化合物をＬｉＯＨで加水分解して、アミノ酸化合物３６を得、スキーム４（図４）に示されるように合成して抱合に適した組成物を調製しうる。
【０２０３】
実施例１１－化合物７０
化合物７０
ツブリシンＤ（Peltier et al., 2006に従って調製した；２ｍｇ，２．４μｍｏｌ）をＭｅＯＨ中に０℃で溶解させた。この溶液に、ＨＣｌ（０．１Ｍ）を１滴加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、次いで溶液を減圧下で蒸発させて、残渣を得、短カラム（ＤＣＭ：ＭｅＯＨ　０－１０％）に通して、化合物７０（１．３ｍｇ，１．６μｍｏｌ，６７％）を油状物として得た。MS (ES+) m/z, 計算値: m+1, 772.42, 実測値, 772.
【化９４】



70

【０２０４】
当業者は、特に上記で示された方法以外に、一般的な方法が本化合物を調製するために用いられうることを理解する。例えば、化合物１４（化合物４９と同一である）は、Ｔｕｐサブユニットに関して他の化合物とカップリングさせることによって多くの他の本化合物を調製するために用いられうる。別の例として、化合物９（スキーム１）、化合物４４および４６（スキーム５）で用いられる試薬を変えることによって、特に例示されているものを超える式（ＩＩ）の基R^2およびR^3を変えた化合物が合成されうる。
【０２０５】
この実施例は、細胞毒素－リンカー構築物（ＶＩ－ｂ）および抗ＣＤ７０モノクローナル抗体２Ｈ５（TerrettらのＵＳ２００９／００２８８７２Ａ１；CocciaらのＷＯ２００８／０７４００４Ａ２）の抱合体の調製を記載している。これは、他の抱合体を調製する際に使用される手順の例である。
【０２０６】
２０ｍＭのリン酸ナトリウム、５０ｍＭのＮａＣｌ、１００μＭのＤＴＰＡ、ｐＨ７．５中で約５ｍｇ／ｍＬの抗ＣＤ７０抗体２Ｈ５を、１３倍モル過剰量の２－イミノチオランでチオール化した。チオール化反応を、継続的に混合しながら室温で１時間進行させた。
【０２０７】
チオール化の後、抗体を、抱合緩衝液（５０ｍＭのＨＥＰＥＳ，５ｍＭのグリシン，２ｍＭのＤＴＰＡ，ｐＨ６．０）に、ＰＤ１０カラム（Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５）により緩衝液交換した。チオール化された抗体濃度を２８０ｎｍで決定した。チオール濃度は、ジチオジピリジンアッセイを用いて測定した。
【０２０８】
ＤＭＳＯ中の構築物（ＶＩ－ｂ）の５ｍＭ　ストックを、抗体の１チオール当たり３倍モル過剰量で加え、室温で９０分間混合させた。抱合後、ＤＭＳＯ中の１００ｍＭのＮ－エチルマレイミドを、１抗体当たりのチオールの１０倍モル過剰量で加えて、未反応のチオール基をクエンチした。このクエンチ反応は、混合を続けながら室温で１時間行った。
【０２０９】

抗ＣＤ７０抗体薬物抱合体を、陽イオン交換クロマトグラフィー精製前に、０．２μｍで濾過した。ＳＰ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商標）高速陽イオン交換カラム（ＣＥＸ）を、５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、５ｍＭのグリシン、１ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０からなる５カラム容量（ＣＶ）で再生させた。再生後、カラムを、３ＣＶの平衡緩衝液（５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、５ｍＭのグリシン、ｐＨ６．０）で平衡化した。抱合体を負荷し、カラムを平衡緩衝液で１回洗浄した。抱合体を５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、５ｍＭのグリシン、２００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０で溶出した。溶出液をフラクションで集めた。次いで、カラムを５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、５ｍＭのグリシン、１ＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０で再生させてタンパク質凝集体および未反応の（ＶＩ－ｂ）をいずれも除去した。

【０２１０】

モノマー抗体抱合体を含有するフラクションを貯留した。抗体抱合体濃度および置換比を、２８０および２５２ｎｍで吸光度を測定することによって決定した。

【０２１１】

精製された溶出液の貯留物を、透析によって、３０ｍｇ／ｍＬのスクロース、１０ｍｇ／ｍＬのグリシン、ｐＨ６．０に緩衝液交換した。透析後、デキストラン４０を試料に１０ｍｇ／ｍＬで加えた。濃度および置換比（ＳＲ）を２８０および２５２ｎｍでの吸光度を測定することによって決定した。ＳＲは、抗体１モル当たり細胞毒素２．２モルであった。

【０２１２】

実施例１３－増殖アッセイ

この実施例は、一般に、本発明の化合物またはその抱合体の抗増殖活性をアッセイするために用いられる手順を記載している。ヒト腫瘍細胞株は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、Ｐ．Ｏ．Ｂｏｘ　１５４９、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ　２０１０８、ＵＳＡから入手し、ＡＴＣＣからの説明書に従って培養した。細胞は、それぞれＡＴＰアッセイまたは^{3}Ｈチミジンアッセイのために、９６ウェルプレートに１．０×１０^{3}または１．０×１０^{4}細胞／ウェルで３時間播種した。遊離（抱合していない）化合物またはその抱合体の１：３の連続希釈液をウェルに加えた。プレートを２４から７２時間インキュベーションした。^{3}Ｈチミジンプレートを、１ウェル当たり１．０μＣｉの^{3}Ｈ－チミジンで全インキュベーション期間のうちの最後の２４時間パルス標識し、回収し、Ｔｏｐ　Ｃｏｕｎｔ　Ｓｃｉｎｔｉｌｌａｔｉｏｎ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｍｅｒｉｄｅｎ、ＣＴ）で読み取った。ＣＥＬＬＴＩＴＥＲ－ＧＬＯ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙキットを製造業者のマニュアルに従って使用して、ＡＴＰプレート中のＡＴＰレベルを測定し、ＧＬＯＭＡＸ（登録商標）２０／２０ルミノメーターで読み取った（いずれもＰｒｏｍｅｇａ製、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ、ＵＳＡ）。ＰＲＩＳＭ（商標）ソフトウェア、バージョン４．０（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ、ＵＳＡ）を用いて、ＥＣ$_{50}$値、すなわち、薬剤が細胞増殖を５０％阻害または減少させる濃度を決定した。

【０２１３】

実施例１４－細胞毒素インビトロ活性

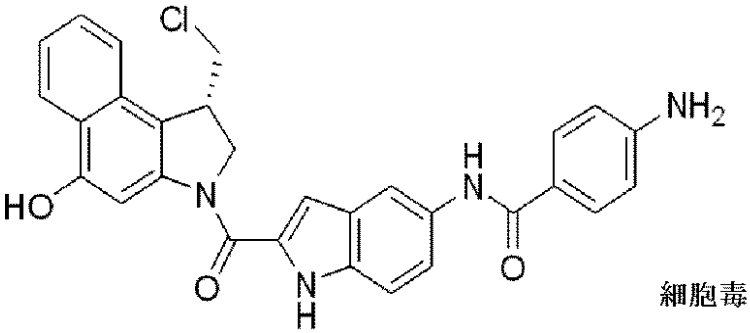
^{3}ＨチミジンもしくはＡＴＰ発光アッセイまたはそれらの両方を用いて、本発明の化合物の活性を、下記の癌細胞株：ＨＣＴ－１５（結腸直腸癌、多剤耐性（ＭＤＲ））；Ｈｅｐ３Ｂ（肝臓癌）；ＬＮＣａＰ（前立腺癌、アンドロゲン受容体陽性（ＡＲ$^{+}$））；ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（乳癌、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体およびＨｅｒ２陰性（三重陰性））；Ａ２０５８（黒色腫）；Ｕ－８７ＭＧ（神経膠芽細胞腫）；ＮＣＩ－Ｈ４６０（ＮＳＣＬＣ）；Ａ５４９（ＮＳＣＬＣ）；ＨＰＡＣ（膵臓癌、原発性）；ＰＣ３（前立腺癌、ＡＲ$^{-}$）；ＢＴ４７４（乳癌、Ｈｅｒ２強陽性（Ｈｅｒ２ｈｉ））；ＳＫＯＶ３（卵巣癌、Ｈｅｒ２ｈｉ）；７８６－Ｏ（腎臓癌）；ＵＯ－３１（腎臓癌、ＭＤＲ）；ＮＣＩ－Ｈ７４０（ＳＣＬＣ）；ＤＭＳ５３（ＳＣＬＣ）；ＳＫ－ＢＲ３（乳癌、Ｈｅｒ２ｈｉ）；ＺＲ－７５（乳癌、エストロゲン受容体陽性）；ＯＶＣＡＲ３（卵巣癌）

；ＨＬ－６０（ＡＰＬ）；ＯＶＣＡＲ８／Ａｄｒ（卵巣癌、ＭＤＲ）；ＣＥＭ－Ｃ１（ＡＬＬ）；Ｎｏｍｏ－１（ＡＭＬ）；ＲＰＭＩ－８２２６（ＭＭ））；Ｒａｊｉ（リンパ腫）；ＳＷ－４８０（結腸直腸癌、転移性）；ＳＷ－６２０（結腸直腸癌）；およびＨ２２６（肺癌）に対してアッセイした。（全ての化合物を全ての細胞系に対してアッセイしたのではない。）

【０２１４】

下記の化合物を対照細胞毒素または比較細胞毒素として使用した：ドキソルビシン（Ｄｏｘ）、細胞毒素ＣＢＩ（シクロプロパ［ｃ］ベンゾ［ｅ］インドール－４－オン群のＤＮＡ小溝アルキル化薬）、ツブリシンＤ（Ｔｕｂ　Ｄ，表１）およびＭＭＡＦのメチルエステル（「ＭＭＡＦ」，オーリスタチン関連化合物；Sutherland et al., J. Biol. Chem. 2006, 281(15), 10540-10547を参照されたい）。

【化９５】



細胞毒素 CBI

【０２１５】

図１１ａおよび１１ｂは、４８時間のインキュベーション期間における、比較化合物として細胞毒素ＣＢＩおよびツブリシンＤを用いたＨＬ－６０および７８６－Ｏ細胞の各々に対する本発明の化合物の ^{3} Ｈチミジン増殖アッセイに関する例示プロットを示す。

【０２１６】

図１２ａおよび１２ｂは、７２時間のインキュベーション期間における、ＨＬ－６０および７８６－Ｏ細胞の各々に対する本発明の化合物の２番目のセットのＡＴＰ発光増殖アッセイに関する例示プロットを示す。図１２ｃおよび１２ｄは、７２時間のインキュベーション期間における、ＨＬ－６０および７８６－Ｏ細胞の各々に対する同じセットの化合物の ^{3} Ｈチミジン増殖アッセイに関するプロットを示す。各場合において、ドキソルビシンを比較化合物として用いた。

【０２１７】

表２は、７２時間のインキュベーション期間における、 ^{3} Ｈチミジン方法を用いる増殖アッセイのデータを提供する。

【表２】

表２(パート１)－^{3}Ｈ チミジン増殖アッセイ

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	HCT-15	Hep3B	LNCaP	MDA-MB-231	A2058	U-87 MG	NCI-H460
Dox	149	44	130	133	－	106	101
CBI	0.040	0.020	0.051	0.019	－	0.14	0.042
Tub D	0.062	0.022	0.36	0.091	－	0.014	0.032
MMAF	1.3	0.11	1.7	0.29	－	0.12	0.37
15	67	1.6	27	1.3	1.6	0.42	2.0
16	284	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	392	>100	>100	84	>100	12	>100
19	1067	52	>100	－	0.13	>100	>100
24	704	32	76	33	0.12	18	>100
25	280	305	930	236	409	271	306
26	31	18	>3000	15	25	5.2	18
26a	>100	36	80	>100	>100	71	>100
28	223	24	64	>100	0.96	>100	>100
29	0.18	0.041	0.54	0.13	0.40	0.064	0.21
29c	2.4	3.0	5.2	4.8	5.6	0.51	15
36	64	39	342	>100	60	15	52
51	101	4.2	41	8.7	0.40	0.75	7.2
54	0.44	0.30	16	1.6	0.64	0.11	0.31
56	2477	>100	>100	>100	>100	>100	>100

【表３】

表２(パート２)－^{3}Ｈ チミジン増殖アッセイ							
化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	A549	HPAC	PC3	BT474	SKOV3	786-O	UO-31
Dox	128	126	276	424	163	168	267
CBI	0.072	0.063	0.049	1.2	0.047	0.035	0.035
Tub D	0.014	0.015	0.038	0.51	0.039	0.15	0.10
MMAF	0.21	0.29	0.38	1.7	0.24	1.4	7.3
(III-q)	－	－	－	－	－	7.61	－
15	2.1	3.0	1.7	7.1	2.6	－	15
16	>100	>100	>100	>100	44	19	>100
17	>100	>100	82	>100	91	32	>100
19	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
24	38	>100	63	>100	68	>100	>100
25	270	206	319	804	180	1862	435
26	18	11	16	11	4.6	26	50
26a	>100	>100	>100	7	47	>100	>100
28	>100	34	>100	>100	9.9	61	>100
29	0.44	0.069	0.21	0.57	0.029	1.2	0.13
29c	6.5	32	11	12	1.9	3.9	1.0
36	44	83	66	>100	32	>100	>100
51	7.8	6.4	5.6	30	4.4	10	35
54	0.24	0.83	0.82	8.8	0.34	6.9	1.3
56	>100	>100	>100	>100	>100	29	>100

【表４】

表２(パート３)－^{3}Ｈ チミジン増殖アッセイ

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	H740	DMS53	SK-BR3	ZR-75	OVCAR3	HL-60	OVCAR8
Dox	255	979	－	794	258	56	2044
CBI	0.098	1.5	－	1.5	0.071	0.027	0.16
Tub D	2.2	0.21	－	1.7	0.051	0.032	0.17
MMAF	13	10	－	42	0.16	0.25	25
(III-q)	－	－	－	－	－	15.05	－
15	2.3	37	17	－	>100	0.60	423
16	>100	>100	>100	>100	>100	8.9	1869
17	32	>100	>100	>100	>100	17	2970
19	3.8	>100	>100	34	53	37	69
24	51	>100	>100	3.6	90	6.9	>100
25	347	515	1714	>3000	379	308	946
26	3.0	99	32	>300	3.2	0.45	201
26a	3.2	>100	158	56	21	10	100
28	5.8	>100	>100	4.3	3.1	7.7	27
29	0.41	0.28	1.1	3.8	0.02	0.0099	0.70
29c	5.3	76	72	44	3.6	1.8	1.4
36	>100	>100	>100	>100	>100	107	>100
51	37	24	>100	1.3	2.5	4.2	20
54	10	2.0	1.1	2.2	3.9	0.53	2.1
56	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>3000

表２(パート４)－^{3}Ｈ チミジン増殖アッセイ

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	CEM-C1	Nomo-1	RPMI-8226	Raji			
Dox	144	105	68	61			
CBI	0.11	0.016	0.12	0.013			
Tub D	0.018	0.042	0.037	0.013			
MMAF	0.17	0.27	0.24	0.12			
15	0.93	2.3	3.3	0.47			
16	11	1.8	22	28			
17	43	6.8	47	53			
19	22	1.3	23	32			
24	13	1.1	17	11			
25	225	116	396	231			
26	22	0.36	7.7	7.0			
26a	10	2.0	22	20			
28	10	0.20	8.7	13			
29	0.019	0.0075	0.034	0.024			
29c	45	0.43	16	8.5			
36	44	124	48	15			
51	2.0	3.5	2.2	1.5			
54	0.38	0.77	0.36	0.20			
56	>100	>100	>100	>100			

【０２１８】
表３は、上記のように、４８、７２または９６時間のインキュベーション期間におけるＡＴＰ発光増殖アッセイのデータを示している。
【表５】

表３（パート１）－ＡＴＰ発光増殖アッセイ(インキュベーション期間)

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	HCT-15 (48 h)	Hep3B (48 h)	MDA-MB-231 (48 h)	A2058 (48 h)	NCI-H460 (48 h)	A549 (48 h)	PC3 (48 h)
Dox	−	443	−	−	−	149	1082
CBI	−	2.6	−	−	−	3.0	12
Tub D	−	0.0012	−	−	−	0.020	0.039
MMAF	−	0.053	−	−	−	0.33	0.43
15	40	6.3	5.6	3.5	6.7	−	>100
16	157	26	28	30	69	−	>100
17	443	>100	65	30	69	−	>100
19	−	18	−	−	−	−	~33
24	−	10	−	−	−	−	13
25	−	246	−	−	−	111	155
26	113	100	120	93	−	−	>3000
26a	−	−	−	−	−	−	−
28	−	17	−	−	−	−	5.8
29	−	1.6	−	−	−	3.9	3.4
29c	200	75	52	32	−	−	66
36	−	86	−	−	−	1.9	78
51	−	3.8	−	−	−	−	16
54	−	1.5	−	−	−	3.0	3.1
56	>3000	>100	>100	>100	>100	−	>100

【表６】

表３（パート２）－ＡＴＰ発光増殖アッセイ(インキュベーション期間)

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	BT474 (48 h)	SKOV3 (48 h)	786-O (48 h)	UO-31 (48 h)	DMS53 (48 h)	SK-BR3 (48 h)	ZR-75 (48 h)
Dox	−	674	360	908	−	−	−
CBI	−	3.0	1.6	4.2	−	−	−
Tub D	−	0.029	0.022	0.099	−	−	−
MMAF	−	0.19	0.71	2.6	−	−	−
15	3.5	4.2	−	−	32	3.9	13
16	19	18	−	−	50	6.6	11
17	23	58	−	>100	~80	24	24
19	8.8	−	−	>100	−	3.9	20
24	4.6	−	−	13	−	8.9	8.4
25	166	−	−	759	366	>3000	1003
26	19	−	−	240	−	253	208
26a	−	−	−	−	−	−	−
28	12	−	−	5.8	−	7.8	16
29	1.5	−	−	2.7	5.3	3.6	15
29c	492	−	−	26	−	278	136
36	~120	−	−	8.8	~300	>300	>300
51	11	−	−	>100	−	13	19
54	4.8	−	−	−	7.9	6.2	9.6
56	>100	>100	−	−	>100	>100	>100
84a	−	−	6.12	−	−	−	−
84b	−	−	4.10	−	−	−	−
109	−	−	1.03	−	−	−	−

【表７】

表３（パート３）－ＡＴＰ発光増殖アッセイ(インキュベーション期間)

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	OVCAR3 (48 h)	HL-60 (48 h)	CEM-C1 (48 h)	Nomo-1 (48 h)	RPMI-8226 (48 h)	HCT-15 (72 h)	LNCaP (72 h)
Dox	632	−	−	−	−	600	592
CBI	4.1	−	−	−	−	3.4	3.3
Tub D	0.085	−	−	−	−	0.014	0.093
MMAF	0.17	−	−	−	−	0.075	0.98
15	>100	−	−	−	−	−	−
16	>100	−	−	−	−	−	−
17	>100	−	−	−	−	−	−
19	25	−	−	−	−	245	−
24	29	−	−	−	−	188	−
25	>3000	224	−	83	−	366	−
26	−	−	61	3.9	45	−	412
26a	−	−	−	−	−	−	−
28	14	−	−	−	−	132	−
29	>100	0.59	−	0.24	−	4.5	−
29c	−	−	20	2.9	70	−	255
36	>300	114	−	34	−	96	>300
36a		0.048	−	−	−	−	−
51	5.5	−	−	−	−	93	−
54	>100	2.5	−	3.1	−	2.6	11
56	>100	−	−	−	−	−	−
84a	8.19	10-28	−	−	−	138	−
84b	4.91	16-27	−	−	−	22.8	−
109		0.019	−	−	−	−	−
112		0.05-.09	−	−	−	−	−

【表８】

表３（パート４）－ＡＴＰ発光増殖アッセイ(インキュベーション期間)

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	MDA-MB-231 (72 h)	A2058 (72 h)	U-87 MG (72 h)	NCI-H460 (72 h)	A549 (72 h)	HPAC (72 h)	BT474 (72 h)
Dox	518	101	324	92	－	215	388
CBI	3.1	0.20	3.3	0.64	－	6.0	5.5
Tub D	0.047	0.0064	0.0054	0.0076	－	－	0.021
MMAF	0.33	0.039	0.052	0.13	－	0.067	0.024
15	－	－	8.6	－	－	－	－
16	－	－	>100	－	－	－	－
17	－	－	22	－	－	－	－
19	32	26	>100	43	－	0.33	－
24	13	14	18	23	－	1.1	－
25	202	212	357	177	－	97	－
26	－	－	94	90	－	279	－
26a	－	－	－	－	－	－	－
28	16	20	18	35	－	5.9	－
29	5.1	2.9	4.9	3.0	－	4.9	－
29c	－	－	136	6.0	－	4.6	－
36	9.6	43	37	16	－	2.9	－
51	－	5.5	7.6	14	－	4.5	－
54	5.6	1.4	1.6	1.6	－	0.96	－
56	－	－	>100	－	－	－	－

【表９】

表３（パート５）－ＡＴＰ発光増殖アッセイ(インキュベーション期間)

化合物	細胞株(ＥＣ$_{50}$，ｎＭ)						
	SKOV3 (72 h)	786-O (72 h)	H740 (72 h)	DMS53 (72 h)	SK-BR3 (72 h)	ZR-75 (72 h)	OVCAR3 (72 h)
Dox	−	−	−	755	441	236	−
CBI	−	−	2.2	3.8	3.1	2.2	−
Tub D	−	−	0.022	0.069	0.025	0.034	−
MMAF	−	−	−	4.5	0.16	0.25	−
(III-q)	−	103.6	−	−	−	−	−
15	−	9.4	−	−	−	−	−
16	−	36	−	−	−	−	−
17	−	73	−	−	−	−	−
19	15	40	−	87	−	−	−
24	13	36	−	>100	−	−	−
25	109	306	−	−	−	−	−
26	38	126	−	193	−	−	49
26a	−	−	−	−	−	−	−
28	11	29	−	58	−	−	−
29	1.3	2.8	−	−	−	−	−
29c	17	34	−	17	−	−	99
36	45	183	−	−	−	−	−
36a	−	0.434	−	−	−	−	−
51	10	19	−	46	−	−	−
54	1.3	2.6	−	−	−	−	−
56	−	>100	−	−	−	−	−
109	−	−	−	−	−	−	0.202
112	−	0.67	−	−	−	−	0.049
133	−	4.17	−	−	−	−	−
134	−	9.89	−	−	−	−	−
135	−	12.94	−	−	−	−	−

表３（パート５）－ＡＴＰ発光増殖アッセイ(インキュベーション期間)

化合物	細胞株およびＥＣ$_{50}$(ｎＭ)						
	HL-60 (72 h)	CEM-C1 (72 h)	Nomo-1 (72 h)	RPMI-8226 (72 h)	Raji (72 h)	SW480 (96 h)	SW-620 (96 h)
Dox	147	161	338	345	301	215	145
CBI	0.76	0.55	0.37	4.1	2.1	0.92	0.33
Tub D	0.0096	0.0030	0.013	0.0051	0.0048	0.020	0.0058
MMAF	0.12	0.11	0.14	0.068	0.084	0.17	0.057
(III-q)	14.27	－	－	－	－	－	－
15	2.7	2.6	2.7	2.6	2.5	5.6	3.7
16	2.8	2.5	3.1	15	3.0	48	29
17	7.4	26	3.9	15	27	92	65
19	7.7	11	5.2	9.6	9.2	52	14
24	6.4	8.7	4.0	8.4	7.9	42	10
25	－	176	－	235	209	261	193
26	27	－	－	－	46	67	48
26a	－	－	－	－	－	－	－
28	2.9	11	0.82	10	15	36	21
29	－	0.85	－	1.0	2.1	2.7	1.5
29c	8.6	－	－	－	36	41	8.4
36	－	40	－	62	24	81	45
51	－	4.8	7.4	5.2	5.0	13	6.4
54	－	1.2	－	1.6	1.2	1.6	1.1
56	>100	>100	>100	5.7	24	>100	28

【０２１９】

さらに、下記のＥＣ$_{50}$値は、ＡＴＰアッセイおよび７２時間インキュベーション期間を用いて、Ｈ２２６細胞系に対する下記の化合物について測定した：化合物３６ａ（０．３０７ｎＭ）；化合物１０９（１．６０９ｎＭ）；および化合物１１２（０．６７～１．１６ｎＭ）。下記のＥＣ$_{50}$値は、ＡＴＰアッセイおよび４８時間インキュベーション期間を用いて、ＯＶＡＣＡＲ８／Ａｄｒ細胞株に対する下記の化合物について測定した：化合物３６ａ（１７．０５ｎＭ）；化合物８４ａ（＞３００ｎＭ）；化合物８４ｂ（４７．２ｎＭ）；化合物１０９（２４．９ｎＭ）；および化合物１１２（１２ｎＭ）。

【０２２０】

実施例１５－抱合体インビトロ活性

図１３は、ＣＤ７０陽性である７８６－Ｏ腎臓癌細胞に対して測定した^{3}Ｈチミジン増殖アッセイにおける本発明の抱合体の活性を示す。インキュベーション期間は７２時間であった。図１３の曲線から抽出されたＥＣ$_{50}$値は、その他の実験からのデータとともに表４に示される。細胞株ＬＮＣａｐは、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）を発現する前立腺癌細胞株であり；Ｈ２２６は、メソテリンを発現する肺癌細胞株である。抱合に用いた抗体としては、２Ａ１０、抗ＰＳＭＡ抗体（HuangらのＵＳ２００９／０２９７４３８）；２Ｈ５、抗ＣＤ７０抗体（TerrettらのＵＳ２００９／００２８８７２）；１Ｆ４、抗ＣＤ７０抗体（CocciaらのＷＯ２００８／０７４００４）；および６Ａ４、抗メソテリン抗体（TerrettらのＷＯ２００９／０４５９５７）であった。対照として、SufiらのＷＯ２００８／０８３３１２（「Ｃｐｄ．Ｊ」、ＤＮＡ小溝結合／アルキル化薬）の化合物Ｊを結合パートナーとして使用し、ジフテリア毒素（「ＤＴＸ」）を抱合されない非特異的な対照として使用した。

【表１０】

表４－抱合体のインビトロ活性

抱合体または試験化合物		細胞株	EC_{50} (nM)
表記	説明		
2A10-Cpd. J	2A10およびCpd. Jの抱合体	786-O	116.7
DTX	抱合されない非特異的な対照	786-O	104.4
2H5-Cpd. J	2H5およびCpd. Jの抱合体	786-O	0.08592
1F4-Cpd. J	1F4およびCpd. Jの抱合体	786-O	0.09951
2H5-(VI-a)	2H5および化合物(VI-a)の抱合体	786-O	0.1151から0.0749
2A10-(VI-a)	2A10および化合物(VI-a)の抱合体	786-O	>> 100
2H5-(VI-b)	2H5および化合物(VI-b)の抱合体	786-O	0.06554
2A10-(VI-b)	2A10および化合物(VI-b)の抱合体	786-O	>> 100
2H5-(VI-n)	2H5および化合物(VI-n)の抱合体	786-O	0.4384
2H5-(VI-m)	2H5および化合物(VI-m)の抱合体	786-O	0.5899
2H5-(VI-q)	2H5および化合物(VI-q)の抱合体	786-O	不活性
2H5-(VI-p)	2H5および化合物(VI-p)の抱合体	786-O	不活性
2H5-(VI-t)	2H5および化合物(VI-t)の抱合体	786-O	0.310
6A4-(VI-t)	6A4および化合物(VI-t)の抱合体	H226	0.360
2A10-(VI-t)	2A10および化合物(VI-t)の抱合体	LNCap	0.570

【０２２１】

データは、抱合体が細胞毒素をＣＤ７０陽性７８６－Ｏ細胞に効率的に送達するためにはＣＤ７０特異的抗体が必要であることを示す：別の抗原（ＰＳＭＡ）に特異的である抗体２Ａ１０抱合体は、活性が低いか、または活性を有さない。逆に、抗ＣＤ７０抗体の全ての抱合体は、活性であった。化合物（ＶＩ－ａ）および（ＶＩ－ｂ）の抱合体は、周知の抱合パートナーであり、その抱合体のうちの１つが臨床試験中である化合物Ｊ抱合体と活性が同程度であった。２Ａ１０－（ＶＩ－ａ）および２Ａ１０－（ＶＩ－ｂ）の活性を、２Ａ１０－ＣＢＩの活性と比較すると、化合物（ＶＩ－ａ）および（ＶＩ－ｂ）の抱合体は、極めて低い非特異的な毒性を示すことに留意すべきである。

【０２２２】

実施例１６－抱合体のインビボ活性

ＣＤ７０陽性ヒト腎臓癌７８６－Ｏ細胞（Ｃａｔ．ＣＲＬ－１９３２、ＡＴＣＣから元々入手）をＡＴＣＣの説明書に従ってインビトロで培養した。当該細胞を回収し、ＤＰＢＳ／ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）の２００μＬ当たり２，５００，０００個の細胞（１：１）を、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスの側腹部領域の皮下に移植した。腫瘍を、Ｆｏｗｌｅｒ Ｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ Ｄｉｇｉｔａｌ Ｃａｌｉｐｅｒ（Ｍｏｄｅｌ ６２３７９－５３１；Ｆｒｅｄ Ｖ．Ｆｏｗｌｅｒ Ｃｏ．，Ｎｅｗｔｏｎ、ＭＡ、ＵＳＡ）を用いて三次元で毎週測定し、データを、Ｓｔｕｄｙｌｏｇ Ｉｎｃ．（Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）製のＳｔｕｄｙＤｉｒｅｃｔｏｒソフトウェアを用いて電子的に記録した。動物を、体位、毛づくろいおよび呼吸変化、さらに傾眠について毎日調べた。動物はまた、体重を毎週測定し、体重の低下が≧２０％であれば、安楽死させた。腫瘍が１９４mm^3の平均サイズに達したら、それぞれ６匹のマウスの群を、単一の腹腔内（ＩＰ）用量の試験抱合体（例えば、２Ｈ５－（ＶＩ－ｂ））およびアイソタイプ対照（２Ａ１０－（ＶＩ－ｂ））を用いて、０．３μｍｏｌ／ｋｇ体重で処置した。腫瘍体積（ＬＷＨ／２）およびマウスの体重を、各実験経過を通して記録し、最初の投薬後約２ヶ月間進行させた。Ｅｘｃｅｌスプレッドシートマクロを用いて、腫瘍サイズの平均、ＳＤおよび中央値を算出した。データは、Ｐｒｉｓｍソフトウェアのバージョン４．０を用いてグラフにした。

【０２２３】

異種移植片の実験結果を図１４に示し、ここで、図の表示は、前の実施例および図１３中の意味と同じである。データは、ＣＤ７０$^{+}$７８６－Ｏ細胞に対する本発明の化合物の抱合体のインビボ活性を示す。抗ＣＤ７０抗体２Ｈ５を有する化合物（ＶＩ－ａ）および（ＶＩ－ｂ）の両抱合体は、全実験過程を通して、平均腫瘍サイズを半分より減少させた一方で、ベヒクル対照または抗ＰＳＭＡ抗体２Ａ１０を有する抱合体が投与された場合、腫瘍平均体積は２倍よりも大きくなった。

【０２２４】

実施例１７－スキーム１３

スキーム１３（図１５）は、本化合物を調製するのに有用である鏡像異性的に純粋な４－ニトロツブフェニルアラニン（４－ＮＯ$_2$Ｔｕｐ）８２ａおよび８２ｂを調製するための方法を示す。

【０２２５】

化合物８０

二炭酸－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（９０．５ｍｇ，０．４２ｍｍｏｌ）を、０．７Ｍ　ＮａＯＨ水溶液（１ｍＬ）中のスキーム３（０．１ｇ，０．３５ｍｍｏｌ）の化合物３４の混合物に加えた。反応混合液を室温で３時間攪拌し、次いで０．５Ｎ　ＨＣｌでｐＨ３まで酸性にした。該水溶液をＥｔＯＡｃで３回抽出し、続いて有機相を合わせて、乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭ中で０－２０％　メタノールのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．１１７ｇの化合物８０を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 253.1 (M+1 Bocなし).

【０２２６】

（－）－メントールエステル化合物８１ａおよび８１ｂ

ＤＣＣ（８７．８ｍｇ，０．４３ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（１．５ｍＬ）中の化合物８０、（－）－メントール（６６．６ｍｇ，０．４３ｍｍｏｌ）および４－（ジメチルアミノ）－ピリジン（「ＤＭＡＰ」，１０．４ｍｇ，０．０８５ｍｍｏｌ）の溶液に室温で加えた。該反応混合液を室温で３時間撹拌し、続いて沈殿物を濾過して除いた。次いで濾液を濃縮した。粗生成物を、ヘキサン中で０－２０％　ＥｔＯＡｃのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、５５．７ｍｇのエステル化合物８１ａを白色の固形物として得て、５５．７ｍｇのエステル化合物８１ｂを白色の固形物として得た。エステル８１ａについてのＭＳ：(+) m/z 391.2 (M+1 Bocなし); エステル８１ｂについてのＭＳ: (+) m/z 391.2 (M+1 Bocなし).

【０２２７】

４－ＮＯ$_2$Ｔｕｐ化合物８２ａおよび８２ｂ

６Ｎ　ＨＣｌ（４０ｍｇ，０．０８２ｍｍｏｌ）中のエステル化合物８１ａの溶液を、１３０℃で１．５時間加熱した。反応混合液を濃縮して、２３．５ｍｇの４－ＮＯ$_2$Ｔｕｐ化合物８２ａを白色の固形物として得た。^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ 8.04 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 3.50 (m, 1H), 3.03 (dd, 1H, J = 6.8, 14.4 Hz), 2.89 (dd, 1H, J = 7.6 Hz, 14.4 Hz), 2.45-2.39 (m, 1H), 1.92-1.84 (m, 1H), 1.62-1.55 (m, 1H), および0.98 (d, 3H, J = 7.2 Hz); MS: (+) m/z 253.1 (M+1). ４－ＮＯ$_2$Ｔｕｐ化合物８２ｂを、同一スケールで同一手順により白色の固形物（２３．５ｍｇ）として得た。^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ 8.03 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.33 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 3.50 (m, 1H), 2.93 (dd, 2H, J = 2.0, 7.6 Hz), 2.54-2.48 (m, 1H), 1.86-1.78 (m, 1H), 1.60-1.53 (m, 1H), および 0.98 (d, 3H, J = 6.8 Hz); MS: (+) m/z 253.1 (M+1).

【０２２８】

実施例１８－スキーム１４

スキーム１４（図１６）は、４－ＮＯ$_2$Ｔｕｐ化合物８２ａおよび８２ｂから本化合物への変換を示す。

【０２２９】

ニトロ酸化合物８３ａ

スキーム３（１０ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）の化合物３４ａを、ＤＣＭ（０．２ｍＬ）中のペンタフルオロフェノール（５．１ｍｇ，０．０２８ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ’－ジイソプロピル－カルボジイミド（「ＤＩＣ」，０．００３２ｍＬ，０．０２１ｍｍｏｌ）の０．２Ｍ溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温に温め、かかる温度で終夜攪拌した。該溶媒を蒸発させた。ＥｔＯＡｃ（１．８ｍＬ）を加え、反応管をＥｔＯＡｃですすぎながら粗生成物を濾過した。濾液を減圧下で濃縮し、粗ペンタフルオロフェニル化合物をさらに精製することなく用いた。ＤＭＦ（０．２ｍＬ）を粗エステル化合物に加え、、続いて４－NO_2Ｔｕｐ化合物８２ａ（１０．７ｍｇ，０．０３７ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．０１３ｍＬ，０．０７４ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、次いで溶媒を蒸発させて取り除いた。粗生成物を、ＤＣＭ中で１％　NH_4OHを含有する０－２０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、１２．９ｍｇのニトロ酸化合物８３ａを白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 773.4 (M+1).

【０２３０】

別の経路のニトロ酸化合物８３ａ：

ＤＩＥＡを、ｐＨを８～９に保ちながら、ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中の化合物３４ａ（１０ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（７．８ｍｇ，０．０２０ｍｍｏｌ）溶液に加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌した。次いで、ＤＭＦ（１ｍＬ）中のＤＩＥＡおよびニトロアミン化合物８２ａ（５．４ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）を、ｐＨを８～９に保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間撹拌し、続いて粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、１３．４ｍｇのニトロ酸化合物８３ａを白色の固形物として得た。

【０２３１】

ニトロ酸化合物８３ｂを、同一スケールで同一の別の経路で調製し、白色の固形物（１３．４ｍｇ）として得た。MS: (+) m/z 773.4 (M+1).

【０２３２】

アミン化合物８４ａ

ＭｅＯＨ（０．３７ｍＬ）中のニトロ酸化合物８３ａ（７．５ｍｇ，０．００９７ｍｍｏｌ）およびパラジウム炭素（１０％，１．１ｍｇ）の混合物を水素雰囲気下で４時間攪拌した。該触媒を濾過して取り除き、濾液を濃縮した。粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、６．２ｍｇのアミン化合物８４ａを白色の固形物として得た。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz): δ 8.06 (s, 1H), 7.36 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.17 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 5.70 (dd, 1H, J = 2.8, 10.8 Hz), 4.71 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 4.44-4.35 (m, 2H), 3.74(d, 1H, J = 9.6 Hz), 3.49-3.45 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 1H), 3.30-3.25 (m, 1H), 3.13 (s, 3H), 3.14-3.04 (m, 1H), 2.93 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 2.74 (s, 3H), 2.48-2.28 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.19-2.03 (m, 2H), 1.95-1.86 (m, 4H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.71-1.57 (m, 3H), 1.24-1.13 (m, 1H), 1.16 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 1.04 (d, 3H, J = 6.4Hz), 1.02 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 0.94 (t, 3H, J = 7.2 Hz), and 0.84 (d, 3H, J = 6.8 Hz); MS: (+) m/z 743.4 (M+1).

【０２３３】

ニトロ酸化合物８３ｂを、８ｍｇスケールで同じ手順を用いて、アミン化合物８４ｂに水素化した。アミン化合物８４ｂを白色の固形物（６．７ｍｇ）として得た。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz): δ 8.06 (s, 1H), 7.35 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.16 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 5.70 (dd, 1H, J = 2.8, 11.2 Hz), 4.72 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 4.49-4.32 (m, 2H), 3.75 (d, 1H, J = 10.0 Hz), 3.49-3.45 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 1H), 3.33-3.31 (m, 1H), 3.12 (s, 3H), 3.12-3.04 (m, 1H), 2.91 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 2.74 (s, 3H), 2.57-2.52 (m, 1H), 2.45-2.37 (m, 1H), 2.33-2.28 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.19-2.13 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 5H), 1.81-1.57 (m, 5H), 1.24-1.13 (m, 1H), 1.17 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 1.04 (d, 3H, J = 6.4Hz), 1.02 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 0.94 (t, 3H, J = 7.2 Hz), and 0.84 (d, 3H, J = 6.4 Hz); MS: (+) m/z 743.4 (M+1).

【０２３４】
化合物８４ａおよび８４ｂはまた、各々、式（ＩＩＩ－ｒ）および（ＩＩＩ－ｓ）で本明細書に示されている。
【０２３５】
実施例１９－スキーム１５
スキーム１５（図１７）は、単一アミノ酸（シトルリン）リンカーを有する本発明の抱合が準備された化合物の合成を示す。
【０２３６】
化合物８５
ＤＭＦ（４ｍＬ）中のスキーム１０（０．２２ｇ，０．６５４ｍｍｏｌ）の化合物６２、Ｆｍｏｃ保護シトルリン（０．３９ｇ，０．９８１ｍｍｏｌ）およびＮ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩（「ＥＤＣＩ」，０．１８８ｇ，０．９８１ｍｍｏｌ）の混合物を室温で終夜攪拌した。飽和NH_4Clを加えて反応をクエンチし、水溶液をＥｔＯＡｃで抽出した。有機相を合わせて、乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭ中で０－１００％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．４２ｇの化合物８５を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 716.4 (M+1).
【０２３７】
化合物８６
ピペリジンを、ｐＨを９～１０に保ちながらＤＭＦ中の化合物８５（０．２４８ｇ，０．３４６ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で２０分間攪拌し、次いで濃縮して、０．１７ｇの化合物８６を得た。MS: (+) m/z 494.4 (M+1).
【０２３８】
化合物８７
水（３ｍＬ）中のＬｉＯＨ（２６．６ｍｇ，１．１１ｍｍｏｌ）を、ＴＨＦ（２ｍＬ）中の化合物８６（０．１７ｇ，０．３４６ｍｍｏｌ）溶液に加えた。反応混合液を室温で２時間攪拌し、次いで溶媒を部分的に除去した。水溶液をＨＣｌでｐＨ２～３まで酸性にし、濃縮した。残渣をＤＭＦ（２ｍＬ）中に再懸濁させ、Ｎ－スクシンイミジル　６－マレイミドヘキサノエート（０．１６ｇ，０．５１９ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．０９１ｍＬ，０．５１９ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で１０分間攪拌し、次いで粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、０．１９８ｇの化合物８７を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 673.4 (M+1).
【０２３９】
化合物８８
ＴＦＡ（０．５ｍＬ）を、ＤＣＭ（０．５ｍＬ）中の化合物８７（１２．５ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）溶液に室温で加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌し、次いで濃縮して、１２．８ｍｇの化合物８８を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 573.4 (M+1).
【０２４０】
化合物８９
ＤＩＥＡを、ｐＨを８～９に保ちながら、ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中のスキーム３の化合物３４ａ（５ｍｇ，０．００９３ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（３．９ｍｇ，０．０１０ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌した。次いで、ＤＭＦ（１ｍＬ）中のＤＩＥＡおよび化合物８８（１２．８ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）を、ｐＨを８～９に保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間攪拌し、続いて粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、８．６ｍｇの化合物８９を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 1093.8 (M+1). 化合物８９はまた、式（ＶＩ－ｍ）として本明細書に示されている。
【０２４１】
化合物９０
ＤＩＥＡを、ｐＨを８～９に保ちながら、ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中のスキーム５の化合

物４９（５ｍｇ，０．００９８ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（４．１ｍｇ，０．０１１ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌した。続いて、ＤＭＦ（１ｍＬ）中のＤＩＥＡおよび化合物８８（１３．５ｍｇ，０．０１９６ｍｍｏｌ）を、ｐＨ８～９を保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間攪拌し、次いで粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、８．９ｍｇの化合物９０を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 1065.6 (M+1). 化合物９０は、式（ＶＩ－ｐ）としても本明細書に示されている。

【０２４２】

実施例２０－スキーム１６

スキーム１６（図１８）は、ジペプチド（シトルリン－バリン）リンカーを有する、本発明の抱合が準備されている化合物の調製を示す。

【０２４３】

化合物９１

ＤＩＥＡを、ｐＨを８～９に保ちながら、ＤＭＦ（０．５ｍＬ）中のＦｍｏｃ保護バリン（６２．３ｍｇ，０．１８４ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（６３．６ｍｇ，０．１６７ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌した。続いて、ＤＭＦ（１ｍＬ）中のＤＩＥＡおよびスキーム１５の化合物８６（８２．５ｍｇ，０．１６７ｍｍｏｌ）を、ｐＨを８～９に保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間攪拌し、次いで０．０５％　ＴＦＡ溶液を加えて反応をクエンチした。水溶液をＥｔＯＡｃで抽出し、有機相を合わせて、乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭ中で０－２０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．１３ｇの化合物９１を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 815.5 (M+1).

【０２４４】

化合物９２

ピペリジンを、ｐＨを９～１０に保ちながら、ＤＭＦ中の化合物９１（０．１４４ｇ，０．１７７ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で２０分間攪拌し、次いで濃縮した。残渣をＴＨＦ（２．５ｍＬ）中に溶解させ、水（１．３ｍＬ）中のＬｉＯＨ（１６．３ｍｇ，０．６８１ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で２時間攪拌し、次いで溶媒を部分的に除去した。水溶液をＨＣｌでｐＨ２～３まで酸性にし、続いて濃縮した。残渣をＤＭＦ（２．５ｍＬ）中に再懸濁し、次いでＮ－スクシンイミジル　６－マレイミドヘキサノエート（０．１０５ｇ，０．３４１ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（０．０６０ｍＬ，０．３４１ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で１０分間攪拌し、次いで粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、０．１１６ｇの化合物９２を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 772.5 (M+1).

【０２４５】

化合物９３

ＴＦＡ（０．６ｍＬ）を、ＤＣＭ（１ｍＬ）中の化合物９２（１４．４ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）溶液に室温で加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌し、続いて濃縮して、１４．７ｍｇの化合物９３を白色の固形物として得た。^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz): δ 7.58 (dd, 2H, J = 1.6, 8.4 Hz), 7.21 (dd, 2H, J = 2.8, 8.8 Hz), 6.79 (s, 2H), 4.48 (m, 1H), 4.13 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 3.57-3.46 (m, 3H), 3.33-3.32 (m, 1H), 3.22-3.09 (m, 2H), 2.91-2.80 (m, 1H), 2.27 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.09-1.85 (m, 3H), 1.81-1.54 (m, 8H), 1.35-1.29 (m, 3H), 1.19 (d, 1.5 H, J = 6.8 Hz), 1.18 (d, 1.5 H, J = 7.2 Hz), 0.98 (d, 3H, J = 2.4 Hz), 0.96 (d, 3H, J = 2.8 Hz); MS: (+) m/z 672.4 (M+1).

【０２４６】

化合物９４

ＤＩＥＡを、ｐＨを８～９に保ちながら、ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中のスキーム３の化合物３４ａ（１１ｍｇ，０．０２０４ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（７．８ｍｇ，０．０２０４ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌した。次いで、ＤＩＥＡお

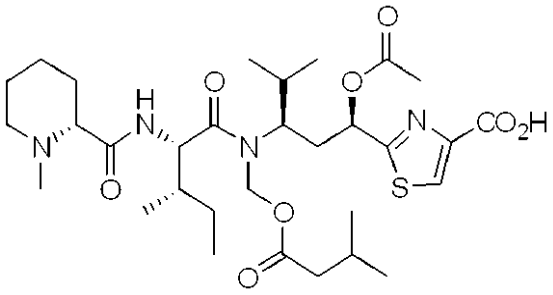
よびＤＭＦ（１ｍＬ）中の化合物９３（１４．７ｍｇ，０．０１９ｍｍｏｌ）を、ｐＨを８～９に保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間攪拌し、続いて粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、１８．９ｍｇの化合物９４を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 1192.6 (M+1). 化合物９４はまた、式（ＶＩ－ｎ）として本明細書に示されている。

【０２４７】

化合物２７のアセテート

無水酢酸（０．２４８ｍＬ）を、ピリジン（２．６ｍＬ）中のスキーム２の化合物２７（Peltier et al., 2006；０．１３ｇ，０．２１８ｍｍｏｌ）の溶液に０℃で加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌した。反応混合液を０℃に冷却し、水および１，４－ジオキサン（１２ｍＬ，ｖ／ｖ　１：１）の溶液を加えた。反応混合液を室温で終夜攪拌し、次いで濃縮した。粗生成物を、ＤＣＭ中で１０－２０％　ＭｅＯＨのグラジエントを用いてシリカゲルから溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、０．１１４ｇの化合物２７のアセテートを白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 639.4 (M+1).

【化９６】



【０２４８】

化合物９５

ＤＩＥＡを、ｐＨを８～９に保ちながら、ＤＭＦ（０．３ｍＬ）中の化合物２７のアセテート（３．８ｍｇ，０．００５９ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（２．５ｍｇ，０．００６５ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で５分間攪拌した。次いで、ＤＭＦ（１ｍＬ）中のＤＩＥＡおよび化合物９３（５．６ｍｇ，０．００７１ｍｍｏｌ）を、ｐＨを８～９に保ちながら加えた。反応混合液を室温で１５分間攪拌し、続いて粗生成物をプレパラティブＨＰＬＣで精製して、６．５ｍｇの化合物９５を白色の固形物として得た。MS: (+) m/z 1292.7 (M+1). 化合物９５はまた、式（ＶＩ－ｏ）として本明細書に示されている。

【０２４９】

実施例２１－スキーム１７

本実施例は、スキーム１７（図１９）に関して、本化合物の調製に有用な中間体である酸化合物１０８の合成を記載する。

【０２５０】

メチルエステル化合物１００

ジオキサン中のＨＣｌ（８．３ｍＬ，４Ｍ，３３．２ｍｍｏｌ）を、ＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中のスキーム１の化合物９（８ｇ，２２．１ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を室温で攪拌した。２０分後、溶液を減圧下で蒸発させて、メチルエステル化合物１００を油状物（６．５ｇ）として得て、さらに精製することなく次の工程に用いた。

【０２５１】

プロピルアミン化合物１０１

プロパナール（７００μＬ、７．３６ｍｍｏｌ）およびＮａＢＨ（ＯＡｃ）$_3$（２．８ｇ，１３．２ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（１０ｍＬ）中のメチルエステル化合物１００（１．９６ｇ，６．６ｍｍｏｌ）の溶液に加えた。反応混合液を５℃で攪拌した。１時間後、該混合物をＥｔＯＡｃ中に溶解させ、７％　K_2CO_3溶液で２回、続いて食塩水で洗浄し

た。ＥｔＯＡｃ層を無水Na_2SO_4で乾燥させ、次いで減圧下で蒸発させて残渣を得、カラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ．０－１０％）に通して、プロピルアミン化合物１０１（１．１２ｇ，６０％）を油状物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.17 (s, 1H), 5.43 (t, J = 4.6 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.07-2.87 (m, 2H), 2.82-2.70 (m, 1H), 2.54 (s, 1H), 2.45-2.26 (m, 2H), 2.16-2.02 (m, 1H), 1.73 (m, 2H), 1.05-0.94 (m, 9H). MS m/z $C_{14}H_{25}N_2O_3S$ $(M+1)^+$ 計算値 301.2, 実測値 301.

【０２５２】

化合物１０２

（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 ヘキサフルオロホスフェート（「ＰｙＢｏｐ」，１．２８ｇ，２．４７ｍｍｏｌ）、ＨＯＢｔ（０．３３ｇ，２．４７ｍｍｏｌ）、Ｂｏｃ保護イソロイシン（４３０μＬ，２．４７ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（５ｍＬ）中のプロピルアミン化合物１０１（５７０ｍｇ，１．９ｍｍｏｌ）溶液に加えた。反応混合液を室温で攪拌した。２０分後、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）を加え、有機相を１０％　クエン酸（２回）、飽和$NaHCO_3$および食塩水で洗浄した。ＥｔＯＡｃ層を無水Na_2SO_4で乾燥させ、次いで減圧下で蒸発させて、残渣を得て、カラムに通して、化合物１０２（０．５５ｇ）を油状物として得た。MS m/z $C_{25}H_{44}N_3O_6S$ $(M+1)^+$ 計算値 514.3, 実測値 514.3.

【０２５３】

アジドエステル化合物１０４

ＤＣＭ（３ｍＬ）中の酸塩化物１０３（２ｍｍｏｌ，Lundquist et al., 2001；スキーム５のアジドエステル化合物４３の調製における上記を参照のこと）を、ＤＣＭ（１０ｍＬ）およびＤＩＥＡ（８７１μＬ，５ｍｍｏｌ）中の化合物１０２（０．５５ｇ，１．１ｍｍｏｌ）溶液に加えた。反応混合液を５℃で攪拌した。１０分間攪拌し、次いで該混合液を減圧下で蒸発させて、残渣を得て、カラムに通してアジドエステル化合物１０４（３００ｍｇ）を油状物として得た。MS m/z $C_{31}H_{53}N_6O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 653.4, 実測値 653.

【０２５４】

化合物１０６

１ｍＬのＥｔＯＡｃ中のペンタフルオロフェニルエステル化合物１０５（２．１ｍｍｏｌ，Peltier et al., 2006）の溶液を、ＥｔＯＡｃ（５ｍＬ）中のアジドエステル化合物１０４（３００ｍｇ，０．４６ｍｍｏｌ）およびＰｄ／Ｃ（１０％，５０ｍｇ）の溶液に加えた。反応フラスコを、バルーンを用いてH_2で充填し、室温で終夜攪拌した。終夜攪拌し、次いで反応混合液を濾過し、減圧下で濃縮し、次いでカラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ，０－１０％）に通して、化合物１０６（１７０ｍｇ）を油状物として得た。MS m/z $C_{38}H_{66}N_5O_8S$ $(M+1)^+$ 計算値 752.5, 実測値 752.5.

【０２５５】

化合物１０７

ＮａＯＨ（１２０μＬ，１．２ｍｍｏｌ，１０Ｍ）を、ＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中の化合物１０６（１７０ｍｇ，０．２２ｍｍｏｌ）の溶液に室温で加えた。２時間攪拌後、反応混合液を濃ＨＣｌでｐＨ２まで酸性にした。次いで、反応混合液を減圧下で蒸発させ、逆相カラム（ＡＣＮ：H_2O，０．１％　ＴＦＡで０－１００％）に通した。凍結乾燥後、化合物１０７（６３ｍｇ）を白色の粉末として得た。ＨＰＬＣプロファイルにより、回転異性体の混合物であることが示された。MS m/z $C_{26}H_{45}N_4O_5S$ $(M+1)^+$ 計算値 525.3, 実測値 525.

【０２５６】

酸化合物１０８

無水酢酸（６０μＬ，０．６４ｍｍｏｌ）を、ピリジン（１ｍＬ）中の化合物１０７（６３ｍｇ，０．１２ｍｍｏｌ）溶液に５℃で加えた。温度を徐々に室温まで上げた。終夜反応させ、次いで水（１００μＬ）を加えた。さらに５時間後、揮発性有機物を減圧下で除去して残渣を得て、逆相カラム（ＡＣＮ：H_2O，０．１％　ＴＦＡで０－１００％）

に通して、酸化合物１０８（４２ｍｇ）を油状物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.35 (s, 1H), 5.71 (dd, J = 11.4, 1.4 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 16.4 Hz, 1H), 3.65-3.42 (m, 2H), 3.21-3.05 (m, 2H), 2.87 (s, 3H), 2.34-2.14 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.03-1.46 (m, 10H), 1.29-1.06 (m, 1H), 1.04-0.85 (m, 15H). MS m/z $C_{28}H_{47}N_4O_5S$ $(M+1)^+$ 計算値 567.3, 実測値 567.

【０２５７】

実施例２２－スキーム１８および１９

スキーム１８（図２０ａおよび２０ｂ）は、前記実施例で調製した酸化合物１０８として用いる本化合物の合成を示す。

【０２５８】

ＨＡＴＵによるカップリングの一般的な手順

ＨＡＴＵ（１．２倍過剰量）およびＤＩＥＡ（４倍過剰量）を、ＤＭＦ中の酸化合物１０８の溶液に５℃で加えた。反応混合液を１０分間攪拌し、次いで対応するアミン化合物を加えた。反応混合液をさらに１０分間攪拌し、ＤＭＳＯおよび０．１％　ＴＦＡ溶液で希釈した。生じた混合物を逆相カラム（ＡＣＮ：H_2O，０．１％ＴＦＡで０－１００％）に通した。収集したフラクションを分析し、所望のフラクションを凍結乾燥して、対応する生成物を得た。

【０２５９】

化合物１０９

酸化合物１０８およびフェニルアラニンメチルエステルのカップリングから得た。MS m/z $C_{38}H_{58}N_5O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 728.4, 実測値 728.4.　化合物１０９はまた、構造（ＩＩ－ｘ）として上記に示されている。

【０２６０】

化合物１１１

酸化合物１０８および化合物１１０のカップリングから得た（下記の調製）。MS m/z $C_{42}H_{63}N_6O_9S$ $(M+1)^+$ 計算値 827.4, 実測値 827.5.

【０２６１】

化合物１１２

２ｍＬのＭｅＯＨ中の化合物１１１（５ｍｇ，６μｍｏｌ）の溶液に、Ｐｄ／Ｃ（１０％，１０ｍｇ）を加えた。反応フラスコを、バルーンを用いてH_2で充填し、室温で２時間攪拌した。次いで、反応混合液を濾過し、減圧下で濃縮し、逆相カラム（ＡＣＮ：H_2O，０．１％　ＴＦＡで０－１００％）に通して、化合物１１２（２．１ｍｇ）を白色の粉末として得た。MS m/z $C_{42}H_{67}N_6O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 799.5, 実測値 799.5.　化合物１１２はまた、構造（ＩＩＩ－ｙ）として上記に示されている。

【０２６２】

化合物１１４

酸化合物１０８および化合物１１３のカップリングから得た（下記の調製）。MS m/z $C_{41}H_{64}N_5O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 770.4, 実測値 770.

【０２６３】

化合物１１６

酸化合物１０８および化合物１１５のカップリングから得た（下記の調製）。MS m/z $C_{61}H_{95}N_{11}O_{13}S$ $(M+2)^+$ 計算値 610.9, 実測値 611.　化合物１１６はまた、構造（ＶＩ－ｔ）として上記に示されている。

【０２６４】

化合物１１７

酸化合物１０８およびアルファ－Ｎ－アセチルリジンメチルエステルのカップリングから得た。MS m/z $C_{37}H_{63}N_6O_8S$ $(M+1)^+$ 計算値 751.4, 実測値 751.5.

【０２６５】

化合物１１０

スキーム８のアルケン化合物５９（メチルエステルの代わりにエチルエステルとする，

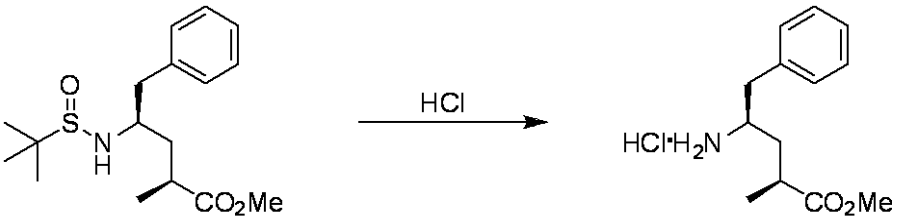
１ｇ、２．６ｍｍｏｌ）を、５％　ＴＦＡを含有するＤＣＭ（１０ｍＬ）中に溶解させ、反応混合液を５℃で攪拌した。４０分後、混合液を減圧下で乾燥させて、化合物１１０（０．３ｇ，１００％）を半固形物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.22-8.17 (m, 2H), 7.50 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 2H), 6.58 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.45 (td, J = 9.8, 5.3 Hz, 1H), 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.35-3.28 (m, 1H), 3.06 (dd, J = 13.2, 9.6 Hz, 1H), 1.55 (d, J = 0.9 Hz, 3H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

【０２６６】

化合物１１３

ＨＣｌ（２．５ｍＬ，１０ｍｍｏｌ，４Ｍ）を、ＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中の化合物１１８（２ｇ，５．５ｍｍｏｌ，Peltier et al., 2006）溶液に加え、反応混合液を室温で攪拌した。２０分後、反応混合液を減圧下で乾燥させて、化合物１１３（２ｇ，１００％）を半固形物として得た。粗生成物をさらに精製することなく次の工程反応に用いた。MS m/z $C_{13}H_{19}NO_2$ $(M+1)^+$ 計算値 222.1, 実測値 222.

【化９７】



118 **113**

【０２６７】

スキーム１９（図２１）は、上記の化合物１１６の合成で用いられる化合物１１５の合成を示す。

【０２６８】

化合物１２０

ＤＩＥＡ（６９７μＬ，１２ｍｍｏｌ）およびバリン ｔ－ブチルエステル化合物５４３（６２７ｍｇ，３ｍｍｏｌ）を、６－マレイミドヘキサン酸（「６－ＭＨＡ」，６２２ｍｇ，３ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（１．１４ｇ，３ｍｍｏｌ）の１０ｍＬのＤＣＭ溶液に加えた。２０分後、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ）を加えた。有機相を、１０％　クエン酸、飽和$NaHCO_3$溶液および食塩水で洗浄した。次いで、無水Na_2SO_4で乾燥させ、溶媒を蒸発により除去した。生じた残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ，０－８０％）に通して、化合物１２０（９００ｍｇ）を油状物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.66 (s, 2H), 5.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 8.7, 4.5 Hz, 1H), 3.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.31-2.06 (m, 3H), 1.73-1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.37-1.25 (m, 2H). MS m/z $C_{19}H_{31}N_2O_5$ $(M+1)^+$ 計算値 367.2, 実測値 367.

【０２６９】

化合物１２１

化合物１２０（１ｇ，２．７３ｍｍｏｌ）を、３ｍＬのＴＦＡを含有する２０ｍＬのＤＣＭ中に室温で溶解させた。１時間後、混合液を蒸発により乾燥させて、化合物１２１（１ｇ）を油状物として得て、さらに精製することなく用いた。MS m/z $C_{15}H_{23}N_2O_5$ $(M+1)^+$ 計算値 311.2, 実測値 311.

【０２７０】

化合物１２３

ＤＩＥＡ（９２０μＬ，５．２８ｍｍｏｌ）および化合物１２２（５００ｍｇ，１．３２ｍｍｏｌ；下記のスキーム２２および実施例２５を参照のこと）に、Ｆｍｏｃ保護シトルリン（５２４ｍｇ，１．３２ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（６０１ｍｇ，１．５８ｍｍｏｌ）の１０ｍＬのＤＭＦ溶液を加えた。２０分後、２００ｍＬのＥｔＯＡｃを加えた。有機相を、１０％　クエン酸、飽和$NaHCO_3$溶液および食塩水で洗浄した。次いで、無

水Na_2SO_4で乾燥させ、ＥｔＯＡｃを蒸発させた。生じた残渣をカラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ；０－１０％）に通して、固形物を得た。この固形物を、５％　ピペリジンを含有するＤＭＦ（５ｍＬ）中に溶解させた。１時間後、溶液を蒸発させ、残渣を逆相カラム（ＡＣＮ：H_2O；０．１％　ＴＦＡで０－１００％）に通して、化合物１２３（２１２ｍｇ）を得た。MS m/z $C_{27}H_{46}N_5O_6$ $(M+1)^+$ 計算値 536.3、実測値 536.4.

【０２７１】

化合物１２４

ＤＩＥＡ（４０４μＬ，２．４ｍｍｏｌ）および化合物５６０（３２１ｍｇ，０．６ｍｍｏｌ）を、化合物５５０（１８０ｍｇ，０．５８ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（２２０ｍｇ，０．５８ｍｍｏｌ）の５ｍＬのＤＭＦ溶液に加えた。２０分後、２００ｍＬのＥｔＯＡｃを加えた。有機相を１０％　クエン酸、飽和$NaHCO_3$溶液および食塩水で洗浄した。次いで、無水Na_2SO_4で乾燥させ、ＥｔＯＡｃを蒸発させた。生じた残渣をカラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ；０－２０％）に通して、化合物１２４（２４０ｍｇ）を油状物として得た。MS m/z $C_{42}H_{66}N_7O_{10}$ $(M+1)^+$ 計算値 828.5, 実測値 828.5.

【０２７２】

化合物１１５

化合物１２４（２４０ｍｇ，０．２９ｍｍｏｌ）をＴＦＡおよびＤＣＭ（１：１）の５ｍＬ溶液中に溶解させた。３時間後、混合液を蒸発により乾燥させ、得られた化合物１１５をさらに精製することなく用いた。ＮＭＲにより、２種類の異性体の混合物（５：１）を得た。主要な異性体を記載する：^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.27 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.79 (s, 2H), 4.48 (dd, J = 13.3, 8.1 Hz, 1H), 4.14 (dd, J = 7.5, 4.9 Hz, 1H), 3.62-3.38 (m, 3H), 3.25-2.97 (m, 3H), 2.96-2.78 (m, 2H), 2.70-2.40 (m, 1H), 2.32-2.21 (m, 2H), 2.11-1.92 (m, 2H), 1.94-1.83 (m, 1H), 1.82-1.70 (m, 1H), 1.70-1.49 (m, 7H), 1.19 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 0.97 (dd, J = 6.8, 2.8 Hz, 6H). MS m/z $C_{33}H_{50}N_7O_8$ $(M+1)^+$ 計算値 672.4, 実測値 672.

【０２７３】

実施例２３－スキーム２０

スキーム２０（図２２）は、本化合物の調製に用いられる中間体である化合物１３１の合成を示す。

【０２７４】

化合物１２５

スキーム１の化合物９（３ｇ，８．２９ｍｍｏｌ）を、ＴＨＦ（２０ｍＬ）および硫酸ジメチル（１．２ｍＬ，１２．４ｍｍｏｌ）中に溶解させた。この溶液に、ＮａＨ（５５２ｍｇ，１３．８ｍｍｏｌ）を５℃で１．５時間かけて少しずつ加えた。次いで反応混合液を飽和NH_4Cl溶液に注ぎ入れた。ＥｔＯＡｃを反応混合液に加え、有機相を食塩水で洗浄し、乾燥させ、減圧下で蒸発させて残渣を得た。生じた残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ，０－１００％）に通して、化合物１２５（１．２ｇ）を油状物として得た。^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.12 (s, 1H), 4.95 (dd, J = 10.0, 3.3 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.45-3.40 (m, 2H), 1.93-1.79 (m, 2H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.20 (s, 9H), 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.80 (d, J = 6.8 Hz, 3H). MS m/z $C_{16}H_{29}N_2O_4S_2$ $(M+1)^+$ 計算値 377.1, 実測値 377.2.

【０２７５】

化合物１２６

ジオキサン中のＨＣｌ（１ｍＬ，４ｍｍｏｌ）を、ＭｅＯＨ（１０ｍＬ）中の化合物１２５（０．７ｇ，１．８６ｍｍｏｌ）溶液に加えた。反応混合液を室温で攪拌した。２０分後、揮発物を減圧下で蒸発させて化合物１２６（０．８ｇ）を油状物として得、さらに精製することなく次の反応工程に用いた。MS m/z $C_{12}H_{21}N_2O_3S$ $(M+1)^+$ 計算値 273.1, 実測値 273.

【０２７６】

化合物１２７
５℃でＤＣＭ（１０ｍＬ）およびＤＩＥＡ（１．８ｍＬ，１０ｍｍｏｌ）中の化合物１２６（６１６ｍｇ，２ｍｍｏｌ）溶液に、５ｍＬのＤＣＭ中の化合物１０３（スキーム１７，６ｍｍｏｌ）を加えた。反応混合液を室温で３時間攪拌した。３時間後、反応混合液を飽和$NaHCO_3$溶液およびＥｔＯＡｃに注ぎ入れた。有機相を食塩水で洗浄し、乾燥させ、蒸発させた。生じた残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ，０－５０％）に通して、化合物１２７（５９４ｍｇ，７２％）を半油状物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (s, 1H), 6.47 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.60-4.52 (m, 1H), 4.23-4.13 (m, 1H), 3.96-3.95 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 2.21-2.08 (m, 1H), 1.94-1.84 (m, 2H), 1.84-1.71 (m, 1H), 1.52-1.38 (m, 1H), 1.35-1.20 (m, 1H), 1.07 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.95-0.85 (m, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 176.00, 168.63, 161.92, 146.90, 128.24, 78.81, 70.34, 58.97, 52.72, 50.76, 40.48, 38.62, 32.24, 24.32, 19.13, 18.13, 16.25, 11.82. MS m/z $C_{18}H_{30}N_5O_4S$ $(M+1)^+$ 計算値 412.2, 実測値 412.3.

【０２７７】
化合物１２９
ヘキサメチルジシラジドカリウム（「ＫＨＭＤＳ」，０．１９ｍｍｏｌ，０．３７５ｍＬのトルエン溶液）を、化合物１２７（５０ｍｇ，０．１２ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（０．５ｍＬ）溶液に－４３℃で加えた。２０分後、化合物１２８（０．３６ｍｍｏｌ，１３７μＬ，Abe et al., 1997）を加えた。２時間後、１００μＬのＭｅＯＨを加え、反応混合液を飽和NH_4Cl溶液に注ぎ入れた。次いでＥｔＯＡｃを加えた。相を分離し、続いて有機相を食塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、溶媒を蒸発により除去した。生じた残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ，０－５０％）に通して、化合物１２９（５１ｍｇ）を半固形物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.16 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.43 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.32 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.39 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 11.7 Hz, 3H), 3.53-3.44 (m, 1H), 3.37 (d, J = 10.5 Hz, 3H), 2.41 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 2.37-2.11 (m, 4H), 1.92 - 1.68 (m, 2H), 1.37-1.21 (m, 1H), 1.12 - 0.85 (m, 18H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 175.24, 172.79, 171.21, 161.90, 147.09, 128.25, 78.44, 68.69, 63.35, 58.71, 52.48, 43.23, 38.63, 34.91, 31.01, 25.73, 25.25, 22.58, 22.56, 22.48, 20.45, 19.62, 16.14, 10.65. MS m/z $C_{24}H_{40}N_5O_6S$ $(M+1)^+$ 計算値 526.3, 実測値 424.3 (N,O アセタールの開裂).

【０２７８】
化合物１３０
化合物１２９（２００ｍｇ，０．３８ｍｍｏｌ）および１０５（Peltier et al., 2006；４ｍｍｏｌ）を、室温にてＰｄ／Ｃ（１５０ｍｇ，１０％）を含有する５ｍＬのＥｔＯＡｃ中で混合した。反応フラスコを排気し、バルーンを用いてH_2で再充填した。室温で終夜攪拌し、次いで混合液を濾過し、溶媒を蒸発させた。カラムクロマトグラフィー（SiO_2，ＭｅＯＨ：ＤＣＭ，０－１０％）後、化合物１３０（９７ｍｇ）を固形物として得た。MS m/z $C_{31}H_{53}N_4O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 625.4, 実測値 625.5.

【０２７９】
化合物１３１
水酸化トリブチルスズ（１８１ｍｇ，０．５９ｍｍｏｌ）を、１０ｍＬ　１，２－ジクロロエタン中の化合物１３０（９７ｍｇ，０．１６ｍｍｏｌ）溶液に加えた。６７℃で２２時間後、混合液を蒸発させ、逆相カラム（ＡＣＮ：（２０ｍＭ　$NH_4(HCO_3)$緩衝液，ｐＨ７），５－１００％）に通して、化合物１３１（３４ｍｇ）を固形物として得た。MS m/z $C_{30}H_{51}N_4O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 611.3, 実測値 510 (N, Oアセタールでの開裂).

【０２８０】
実施例２４－スキーム２１
スキーム２１（図２３）は、化合物１３１を前駆体として用いる本化合物の合成を示す。

【０２８１】
化合物１３２
化合物６０（スキーム８，２００ｍｇ，０．５７ｍｍｏｌ）を、２０％ ＴＦＡを含有する２ｍＬのＤＣＭ中に室温で溶解させた。１時間後、揮発物を蒸発させて、化合物１３２（２００ｍｇ）を黄色の固形物として得て、さらに精製することなく用いた。
【０２８２】
化合物１３３
ＤＩＥＡ（４３μＬ，０．２ｍｍｏｌ）を、化合物１３１（３０ｍｇ，０．０４９ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（２２．３ｍｇ，０．０５９ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（１ｍＬ）溶液に－４３℃で加えた。１０分後、化合物１３２（１５ｍｇ，０．０６ｍｍｏｌ）を加えた。次いで、混合物を室温に上げた。最終混合物を逆相カラム（ＡＣＮ：（２０ｍＭ NH_4（HCO_3）緩衝液，ｐＨ７），５－１００％）に通して、化合物１３３（２０ｍｇ）を白色の粉末として得た。MS m/z $C_{44}H_{73}N_6O_8S$ $(M+1)^+$ 計算値 843.5，実測値 843.5．化合物１３３はまた、上記で構造（ＩＩＩ－ｕ）としても示されている。
【０２８３】
化合物１３４
化合物１３３（２ｍｇ，２．４μｍｏｌ）を、０．５ｍＬのメタノール中に溶解させ、溶液のｐＨを１Ｍ ＨＣｌで１に調整した。終夜攪拌し、次いで揮発物を蒸発させ、残渣を逆相カラム（ＡＣＮ：（２０ｍＭ NH_4（HCO_3）緩衝液，ｐＨ７），５－１００％）に通して、化合物１３４（０．７ｍｇ）を白色の粉末として得た。MS m/z $C_{40}H_{65}N_6O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 773.5，実測値 773.5．化合物１３４はまた、上記で構造（ＩＩＩ－ｖ）としても示されている。
【０２８４】
化合物１３５
化合物１３３（２ｍｇ，２．４μｍｏｌ）を、０．５ｍＬのｎ－プロパノール中に溶解させ、溶液のｐＨを１Ｍ ＨＣｌで１に調整した。終夜攪拌し、次いで混合液を蒸発させて、残渣を逆相カラム（ＡＣＮ：（２０ｍＭ NH_4（HCO_3）緩衝液，ｐＨ７），５－１００％）に通して、化合物１３５（０．４ｍｇ）を白色の粉末として得た。MS m/z $C_{42}H_{69}N_6O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 802.5，実測値 801.5．化合物１３５はまた、上記で構造（ＩＩＩ－ｗ）としても示されている。
【０２８５】
実施例２５－スキーム２２
スキーム２２（図２４）は、本化合物の調製のための中間体として有用である化合物１４２を調製するための方法を示す。
【０２８６】
化合物１３６
ＮａＯＨ（８００μＬ，１０Ｍ，８ｍｍｏｌ）を、スキーム８の化合物５９（１．６５ｇ，４．３７ｍｍｏｌ）を含有するＴＨＦおよびＭｅＯＨ（１：１）の２０ｍＬ溶液に加えた。終夜攪拌し、次いで、溶液のｐＨを、５℃で３Ｎ ＨＣｌを用いて１に調整した。溶媒の蒸発後、２００ｍＬのＥｔＯＡｃを加えた。分離後、有機相を食塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、ＥｔＯＡｃを蒸発させた。残渣をカラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ；０－１０％）に通して、化合物１３６（１．２ｇ）を油状物として得た。^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21-8.12 (m, 2H), 7.41-7.32 (m, 2H), 6.62 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.82-4.57 (m, 2H), 3.15-3.02 (m, 1H), 2.90 (dd, J = 13.3, 7.2 Hz, 1H), 1.71 (d, J = 1.2 Hz, 3H), 1.41 (s, 9H).
【０２８７】
化合物１３７
ＤＭＦ－ジ－ｔ－ブチルアセタール（１ｍＬ，４ｍｍｏｌ）を、１３３℃で化合物１３６（１２８ｍｇ，０．３６ｍｍｏｌ）の６ｍＬ トルエン溶液中に加えた。１０分後、反応混合液を冷まし、溶媒を蒸発させた。残渣をカラム（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ；０－３０

%）に通して、化合物１３７（１３３ｍｇ）を油状物として得た。^{1}H NMR (400 MHz, CDCl$_3$) δ 8.19-8.10 (m, 2H), 7.39-7.30 (m, 2H), 6.39 (dd, J = 9.1, 1.5 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 39.1 Hz, 2H), 3.03 (dd, J = 13.2, 6.2 Hz, 1H), 2.90 (dd, J = 13.3, 7.0 Hz, 1H), 1.67 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.39 (s, 9H).

【０２８８】

化合物１２２

化合物１３７（５４０ｍｇ，１．２２ｍｍｏｌ）、Ｐｄ／Ｃ（１３６ｍｇ，１０％）および３Ｎ　ＨＣｌ（０．３ｍＬ）を、ＤＣＭおよびＭｅＯＨの混合液（３０ｍＬ：５ｍＬ）に加えた。フラスコを、バルーンを用いてＨ$_2$で充填した。室温で終夜攪拌し、次いで混合液を濾過し、濃縮して、化合物１２２（５５０ｍｇ）を半固形物として得た。MS m/z $C_{21}H_{35}N_2O_4$ $(M+1)^+$ 計算値 379.3, 実測値 223 (Bocの喪失).

【０２８９】

化合物１３８

化合物１３６（１００ｍｇ，０．２８ｍｍｏｌ）およびＰｄ／Ｃ（２０ｍｇ，１０％）を、室温で水素バルーン下にて、ＭｅＯＨおよびＤＣＭ（１：１　ｖ：ｖ）の５ｍＬの混合液中で混合させた。終夜攪拌し、次いで該混合液を濾過し、溶媒を減圧下で蒸発させて、化合物１３８（９５ｍｇ）を油状物として得て、さらに精製することなく次の反応工程に用いた。MS m/z $C_{17}H_{27}N_2O_4$ $(M+1)^+$ 計算値 323.2, 実測値 223.

【０２９０】

化合物１３９

化合物１３８（１０ｍｇ，０．０３ｍｍｏｌ）、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド（「ＴＢＤＭＳＣｌ」，４．５ｍｇ，０．０３ｍｍｏｌ）およびイミダゾール（４ｍｇ，０．０６ｍｍｏｌ）を、１ｍＬのＤＭＦ中に室温で混合させた。Ｆｍｏｃ保護シトルリン（２４ｍｇ，０．０６ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジル オキサレート（「ＤＳＯ」，８ｍｇ，０．０６ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（２０μＬ，０．１２ｍｍｏｌ）を、さらに１ｍＬのＤＭＦ中に室温で混合させた。１時間後、２種類の溶液を混合し、混合液を室温に保った。終夜攪拌し、ＥｔＯＡｃを加え、溶液を１０％　クエン酸水溶液および食塩水で洗浄した。次いで、有機相を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、減圧下で蒸発させた。生じた残渣をカラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ，０－１０％）に通して、化合物１３９（７ｍｇ）を油状物として得た。MS m/z $C_{38}H_{48}N_5O_8$ $(M+1)^+$ 計算値 702, 実測値 702.

【０２９１】

化合物１４１

化合物１３９（１０ｍｇ，０．０１４ｍｍｏｌ）を、５％　ピペリジンを含有する１ｍＬのＤＭＦ中に溶解させた。２０分後、溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣を、１ｍＬのＤＭＦ中のＮ－スクシンイミジル－４－マレイミドブチレート１４０（５．６ｍｇ，０．０２８ｍｍｏｌ）およびＤＩＥＡ（５μＬ，０．０２８ｍｍｏｌ）と混合させた。１０分後、溶媒を減圧下で反応混合液から除去し、カラム（ＭｅＯＨ：ＤＣＭ，０－２０％）に通して、化合物１４１（６ｍｇ）を固形物として得た。MS m/z $C_{31}H_{45}N_6O_9$ $(M+1)^+$ 計算値 645, 実測値 645.

【０２９２】

化合物１４２

化合物１４１（６ｍｇ，０．０１ｍｍｏｌ）を、１０％　ＴＦＡを含有する１ｍＬのＤＣＭ中に溶解させた。１０分後、溶媒を減圧下で蒸発させて、化合物１４２（６ｍｇ）を得て、さらに精製することなく次の反応工程に用いた。

【０２９３】

実施例２６－スキーム２３

スキーム２３（図２５）は、スキーム２２に従って調製した化合物１４２の本化合物への合成を示す。

【０２９４】

化合物１４５

１５０μＬのＭｅＯＨ中のＨＣｌ（３０μｍｍｏｌ）を、０．７ｍＬのＭｅＯＨ中のスキーム２の化合物２７（５ｍｇ，８．３μｍｍｏｌ）の溶液に５℃で加えた。温度を徐々に室温まで上げた。終夜攪拌し、次いで混合液を蒸発させ、０．７ｍｌのピリジン中に溶解させた。この溶液に、Ac_2O（２８μＬ，２９６μｍｍｏｌ）を５℃で加えた。温度を徐々に室温まで上げ、終夜攪拌し、続いて５０μＬのH_2Oを加えた。３時間後、揮発物を蒸発させ、生じた残渣を蒸発させて、化合物１４５（４．７ｍｇ）を半固形物として得た。MS m/z $C_{27}H_{45}N_4O_7S$ $(M+1)^+$ 計算値 569.3，実測値 569.

【０２９５】

化合物１４６

ＤＩＥＡ（６μＬ，３４μｍｏｌ）および化合物１４２（５．５ｍｇ，８．３μｍｏｌ）を、化合物５３０（４．７ｍｇ，８．３μｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（３．２ｍｇ，８．４μｍｏｌ）の０．５ｍＬのＤＭＦ溶液に５℃で加えた。２０分後、生じた混合物を逆相カラム（ＡＣＮ：（２０ｍＭ　NH_4（HCO_3）緩衝液，ｐＨ７），５－１００％）に通して、化合物１４６（４．５ｍｇ）を白色の固形物として得た。MS m/z $C_{53}H_{79}N_{10}O_{13}S$ $(M+1)^+$ 計算値 1095.5，実測値 1095.5．化合物１４６はまた、上記で構造（ＶＩ－ｒ）としても示されている。

【０２９６】

化合物１４７

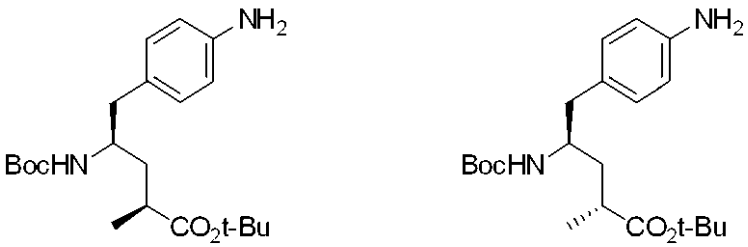
ＤＩＥＡ（１．４μＬ，８μｍｏｌ）および１滴の飽和NH_4Cl溶液を、化合物１４６（２ｍｇ，１．８μｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（１．６ｍｇ，４．６μｍｏｌ）の０．５ｍＬのＤＭＦ溶液に加えた。１０分後、混合液を逆相カラム（ＡＣＮ：（２０ｍＭ　NH_4（HCO_3）緩衝液，ｐＨ７），５－１００％）に通して、化合物１４７（０．５ｍｇ）を半固形物として得た。MS m/z $C_{53}H_{80}N_{11}O_{12}S$ $(M+1)^+$ 計算値 1094.6，実測値 1094.　化合物１４７はまた、上記で構造（ＶＩ－ｓ）としても示されている。

【０２９７】

実施例２７－４－アミノツブフェニルアラニンジアステレオマー

化合物１２２（上記実施例２５）は、下記のようにジアステレオマー１４８ａおよび１４８ｂの３：１混合物であることを決定した。

【化９８】

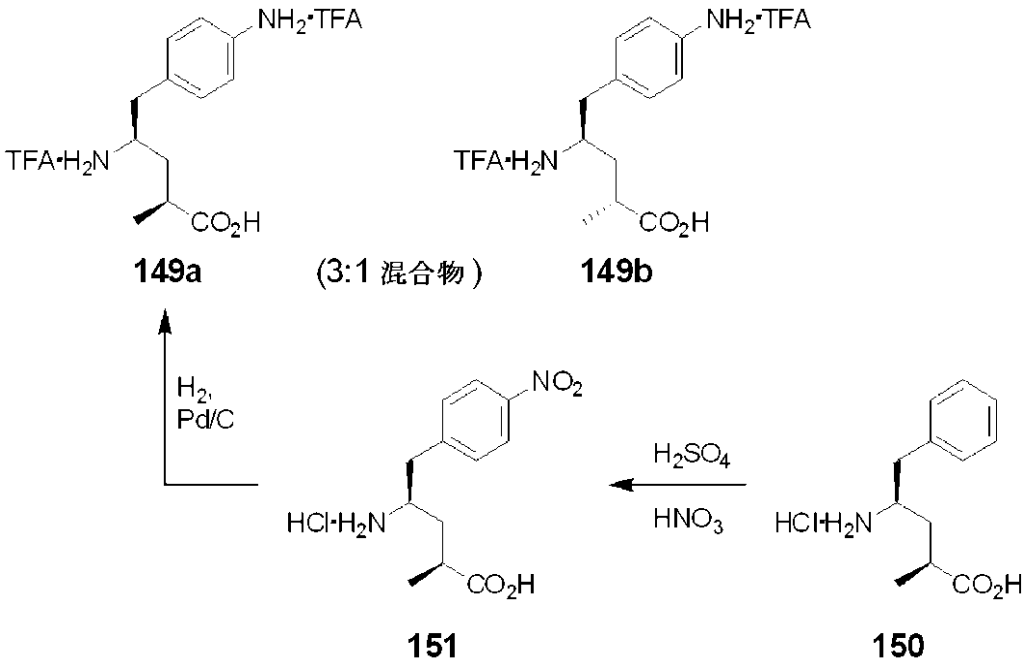


148a　(3:1混合物)　**148b**

【０２９８】

化合物１２２（１０ｍｇ，０．０２６ｍｍｏｌ）を、ＴＦＡおよびＤＣＭ（１：１）の２ｍＬの混合液中に室温で溶解させた。３時間後、溶媒を蒸発させ、残渣を逆相カラム（ＡＣＮ：H_2O；０．１％　ＴＦＡで０－１００％）に通して、化合物１４９ａおよび１４９ｂの３：１混合物を得た。この混合物中の主要な異性体は、混合物のＮＭＲスペクトルを、化合物１５０から調製した化合物１４９ａの基準サンプルのＮＭＲスペクトルと比較することによって構造１４９ａと同定した。

【化９９】



【０２９９】

濃ＨＮＯ$_3$（１０μＬ）を、ツブフェニルアラニン１５０（Peltier et al., 2006；６ｍｇ，０．０２５ｍｍｏｌ）の２００μＬの濃Ｈ$_2$ＳＯ$_4$溶液に５℃で加えた。２０分後、溶液を２ｍＬの冷７％　Ｋ$_2$ＣＯ$_3$溶液に注ぎ入れた。次いで１０ｍＬのＥｔＯＡｃを加えた。分離後、有機相を蒸発により乾燥させ、残渣を逆相カラム（ＡＣＮ：Ｈ$_2$Ｏ；０．１％　ＴＦＡで０－１００％）に通して、ニトロ化合物１５１（５ｍｇ）を得た。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.27-8.21 (m, 2H), 7.56-7.49 (m, 2H), 3.69-3.58 (m, 1H), 3.07 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 2.73-2.61 (m, 1H), 2.04-1.91 (m, 1H), 1.64 (ddd, J = 14.7, 8.2, 4.9 Hz, 1H), 1.20 (d, J = 7.1 Hz, 3H). MS m/z $C_{12}H_{17}N_2O_4$ $(M+1)^+$ 計算値 253.1, 実測値 253.

【０３００】

次いで、ニトロ化合物１５１を以下のように化合物１４９ａに変換した：ニトロ化合物１５１（５ｍｇ，０．０１ｍｍｏｌ）を、５ｍＬのＭｅＯＨ中のＰｄ／Ｃ（１０ｍｇ，１０％）と室温で混合させた。フラスコを、バルーンを用いてＨ$_2$で充填した。１時間後、混合液を濾過し、蒸発させて、化合物１４９ａ（４．５ｍｇ）を得た。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.08-7.03 (m, 2H), 6.83-6.79 (m, 2H), 3.51-3.41 (m, 1H), 2.84-2.78 (m, 2H), 2.68-2.58 (m, 1H), 2.04-1.92 (m, 1H), 1.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 1.18 (d, J = 7.0, Hz, 3H). MS m/z $C_{12}H_{19}N_2O_2$ $(M+1)^+$ 計算値 223.1, 実測値 223.　このＮＭＲスペクトルに基づいて、１４８ａ／１４８ｂおよび１４９ａ／１４９ｂ混合物の主要な構成成分の構造を同定した。

【０３０１】

化合物１２２の試料を逆相カラム（ＡＣＮ：Ｈ$_2$Ｏ；０．１％　ＴＦＡで０－１００％）に通し、微量の異性体を含有するフラクションを収集し、凍結乾燥させた。次いで、得られた生成物をＴＦＡおよびＤＣＭで処理して、Ｂｏｃ基を除去した。１時間後、溶媒を蒸発させて、生成物を得て、そのＮＭＲスペクトルを化合物１４９ａのものと比較し、化合物１４９ｂであると同定した。化合物１４９ｂ：^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) 7.36-7.23 (m, 2H), 7.22-7.09 (m, 2H), 3.59-3.40 (m, 1H), 3.04-2.84 (m, 2H), 2.61-2.45 (m, 1H) 2.07-1.87 (m, 1H), 1.73-1.58 (m, 1H), 1.21-1.09 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

【０３０２】

化合物１４８ａ、１４８ｂ、１４９ａおよび１４９ｂは、４－アミノツブフェニルアラニンサブユニットを有する本化合物を調製するために用いることができ、当該アルファー

メチル基の立体化学は、上記で例示される合成方法を適宜変更して用いて定義されるものである。化合物８２ａおよび８２ｂ（実施例１７）はまた、同様の用途に用いることができる。

【０３０３】

前記の発明の詳細な説明には、本発明の態様の特定の部分に主として、または単独で関連する一部が含まれる。それは、明確性および利便性のためであり、ある特定の特徴が開示されている単なる一部よりも大きく関連し、本明細書の開示では、異なる部分で見出された情報の適当な組み合わせの全てが含まれることが理解されるべきである。同様に、本明細書に記載の様々な図面および記載は本発明の特定の態様に関するものであるが、ある特定の特徴がある特定の図面または態様の中で開示されている場合、かかる特徴もまた、適当な範囲で、別の図面または態様の中で、別の特徴との組み合わせにおいて、あるいは一般的な発明において用いることができることも理解されるべきである。

【０３０４】

さらに、本発明がある好ましい態様について特に記載されているが、本発明は、かかる好ましい態様に限定されるものではない。むしろ、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定められる。

【０３０５】

引用文献

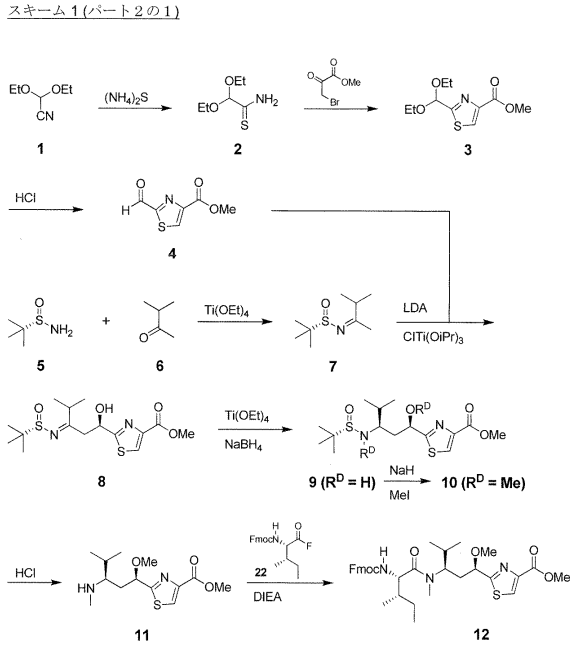
下記の全ての引用文献は、筆頭著者（または発明者）によって省略した形で引用されており、本明細書より早い日付のものが下記に提供される。これらの文献の各々は、全ての目的のために出典明示により本明細書に取り込まれる。

Abe et al., WO 97/21712 (1997).
Boyd et al., US 2008/0279868 A1 (2008).
Boyd et al., US 7,691,962 B2 (2010).
Balasubramanian et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 2996-2999.
Balasubramanian et al., J. Med. Chem. 2009, 52 (2), 238-240.
Davis et al., US 2008/0176958 A1 (2008).
Domling, DE 10 2004 030 227 A1 (2006).
Domling et al., US 2005/0239713 A1 (2005) [2005a].
Domling et al., US 2005/0249740 A1 (2005) [2005b].
Domling et al., Mol. Diversity 2005, 9, 141-147 [2005c].
Domling et al., Ang. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 7235-7239.
Ellman et al., WO 2009/012958 A2 (2009).
Hamel et al., Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents 2002, 2, 19-53.
Hoefle et al., DE 100 08 089 A1 (2001).
Hoefle et al., Pure Appl. Chem. 2003, 75 (2-3), 167-178.
Hoefle et al., US 2006/0128754 A1 (2006) [2006a].
Hoefle et al., US 2006/0217360 A1 (2006) [2006b].
Kaur et al., Biochem. J. 2006, 396, 235-242.
Khalil et al., ChemBioChem 2006, 7, 678-683.
Leamon et al., Cancer Res. 2008, 68 (23), 9839-9844.
Leamon et al., WO 2009/002993 A1 (2009).
Leung et al., US 2002/0169125 A1 (2002).
Low et al., WO 2009/026177 A1 (2009).
Lundquist et al., Org. Lett. 2001, 3, 781-783.
Neri et al., ChemMedChem 2006, 1, 175-180.
Patterson et al., Chem. Eur. J. 2007, 13, 9534-9541.
Patterson et al., J. Org. Chem. 2008, 73, 4362-4369.
Peltier et al., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 16018-16019.
Reddy et al., Mol. Pharmaceutics 2009, 6 (5), 1518-1525.

Reichenbach et al. WO 98/13375 A1 (1998).
Richter, WO 2008/138561 A1 (2008).
Sani et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3526-3529.
Sasse et al., J. Antibiotics 2000, 53 (9), 879-885.
Sasse et al., Nature Chem. Biol. 2007, 3 (2), 87-89.
Schluep et al., Clin. Cancer Res. 2009, 15 (1), 181-189.
Shankar et al., SYNLETT 2009, 8, 1341-1345.
Shibue et al., Tetrahedron Lett. 2009 50, 3845-3848.
Steinmetz et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 4888-4892.
Ullrich et al., Angew. Chemie Int. Ed. 2009, 48, 4422-4425.
Vlahov et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18 (16), 4558-4561 [2008a].
Vlahov et al., US 2008/0248052 A1 (2008) [2008b].
Vlahov et al., WO 2009/055562 A1 (2009).
Vlahov et al., US 2010/0048490 A1 (2010).
Wang et al., Chem. Biol. Drug. Des 2007, 70, 75-86.
Wipf et al., Org. Lett. 2004, 6 (22), 4057-4060.
Wipf et al., Org. Lett. 2007, 9 (8), 1605-1607.
Wipf et al., US 2010/0047841 A1 (2010).

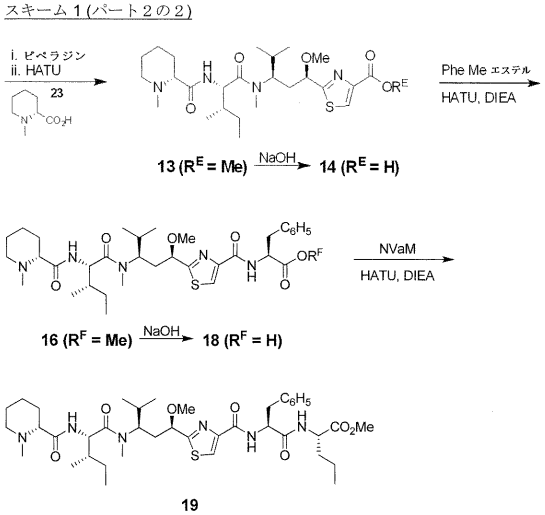
【図１－１】

図1 a



【図１－２】

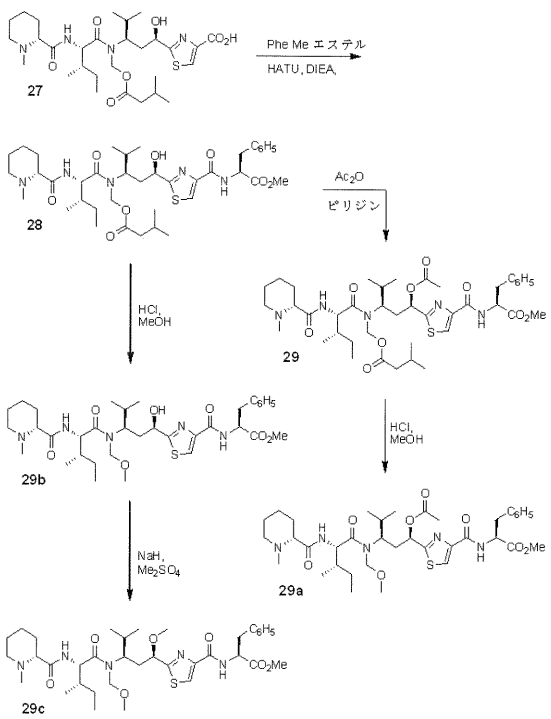
図1 b



【図２】

図２

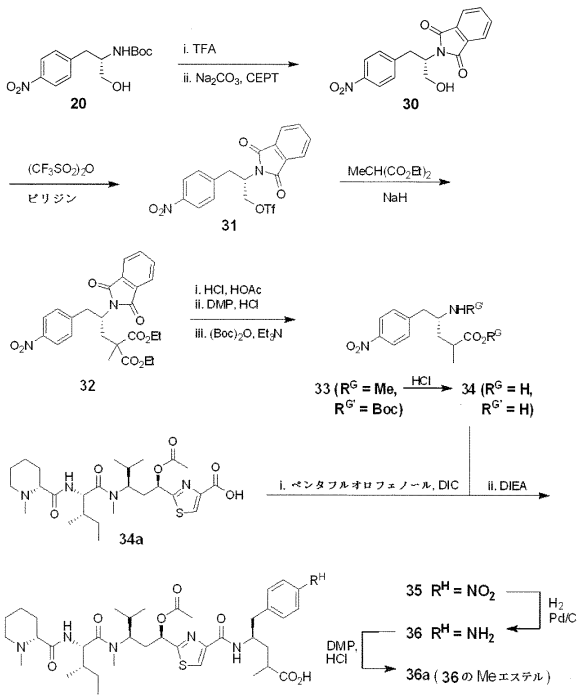
スキーム２



【図３】

図３

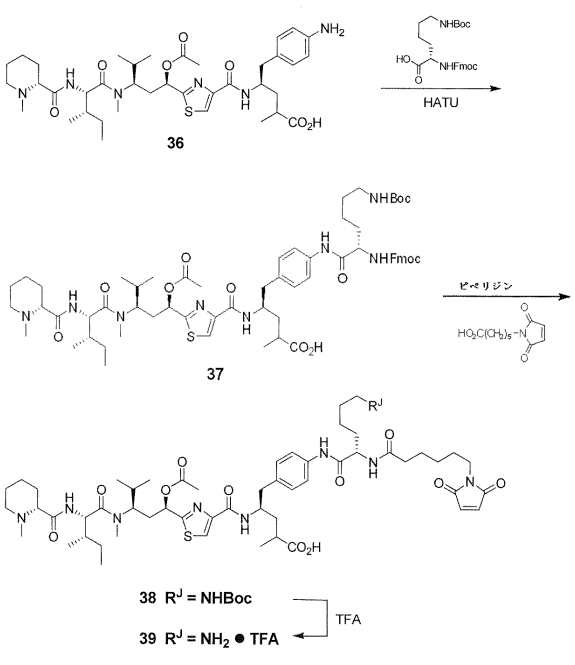
スキーム３



【図４】

図４

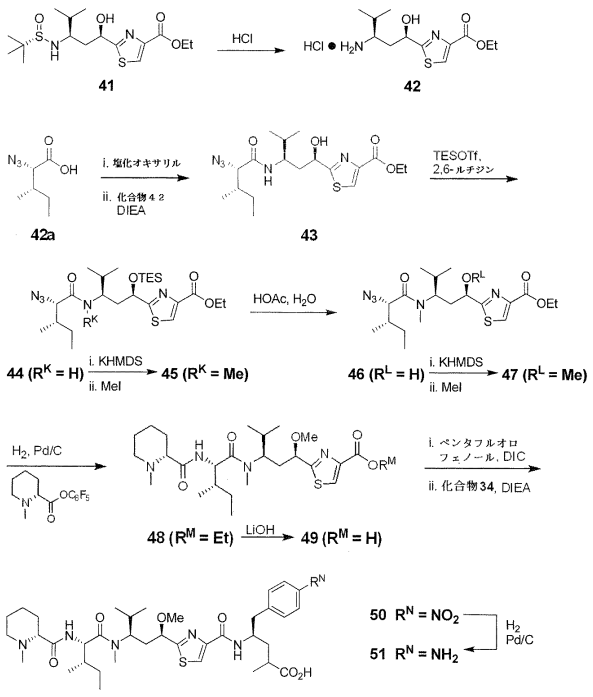
スキーム４



【図５】

図５

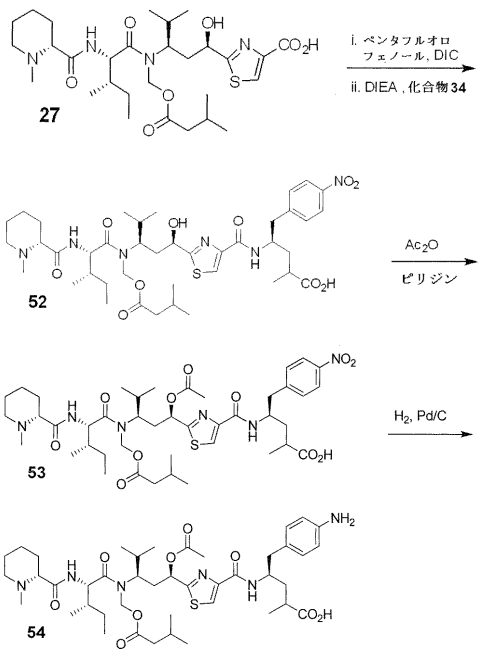
スキーム５



【図６】

図６

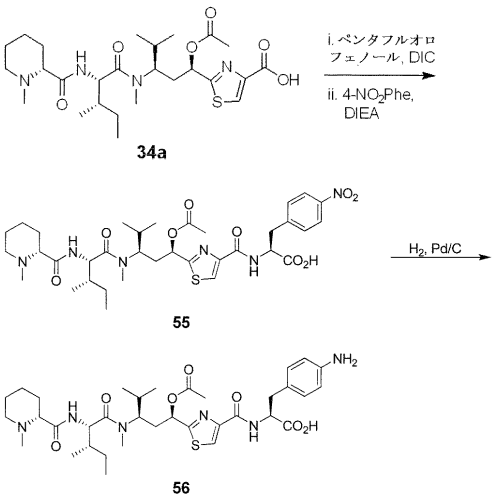
スキーム６



【図７】

図７

スキーム７



【図８】

図８ａ

スキーム８

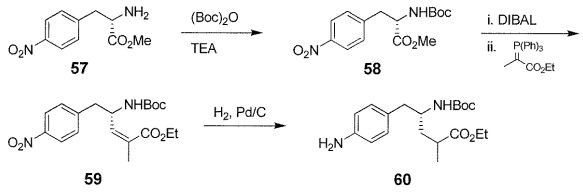


図８ｂ

スキーム９

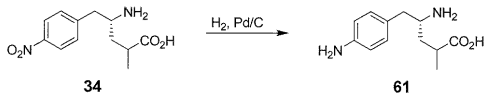
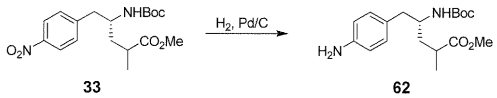


図８ｃ

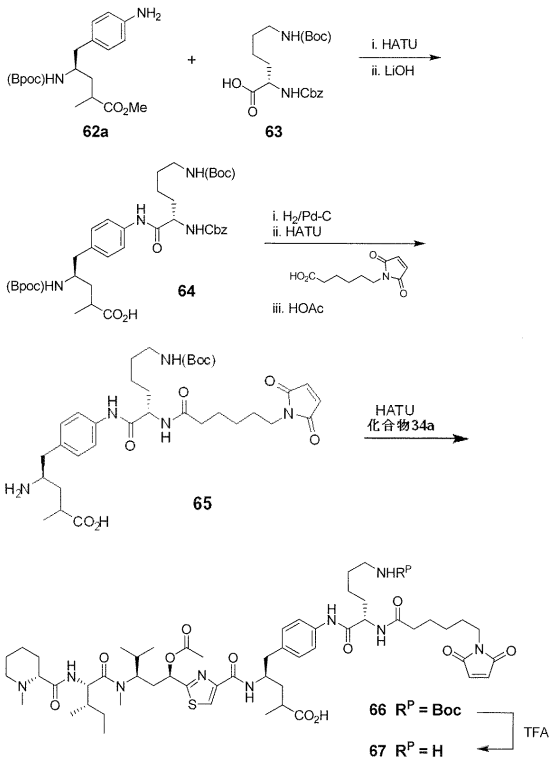
スキーム１０



【図９】

図９

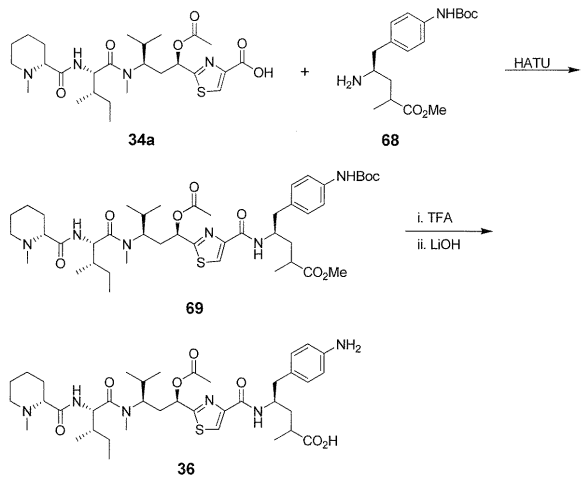
スキーム１１



【図１０】

図１０

スキーム 12



【図１１】

図１１ａ

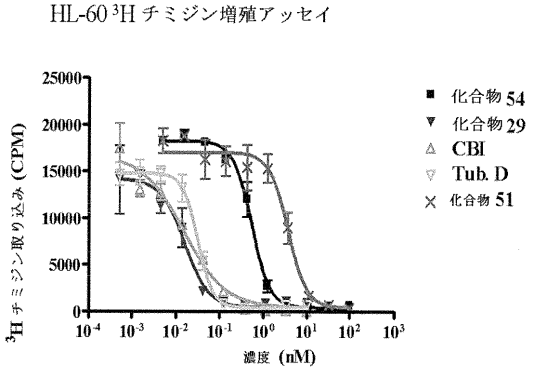
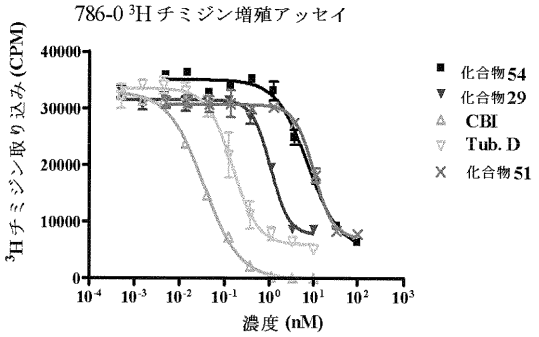


図１１ｂ



【図１２－１】

図１２ａ

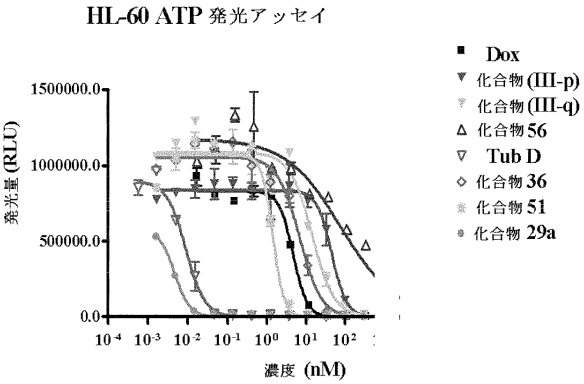
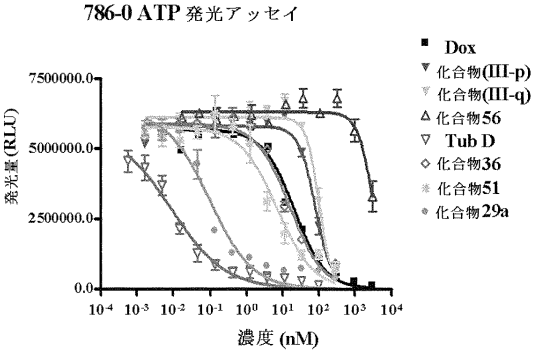


図１２ｂ



【図１２－２】

図１２ｃ

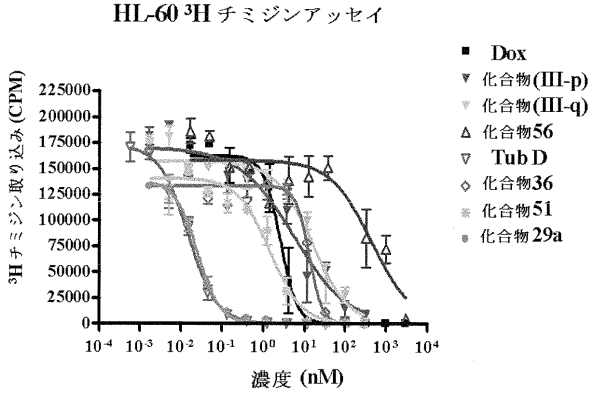
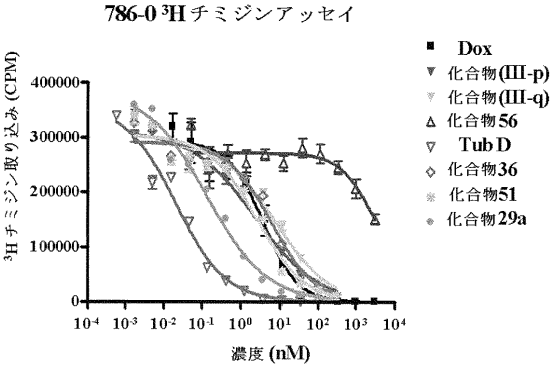
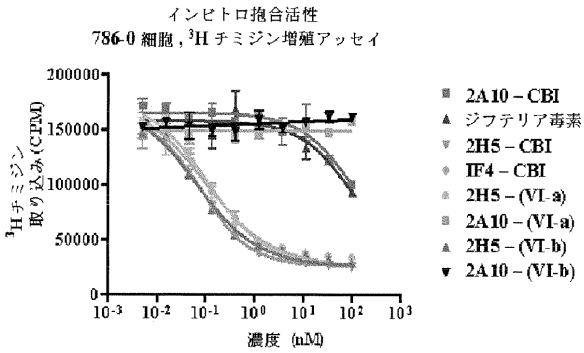


図１２ｄ



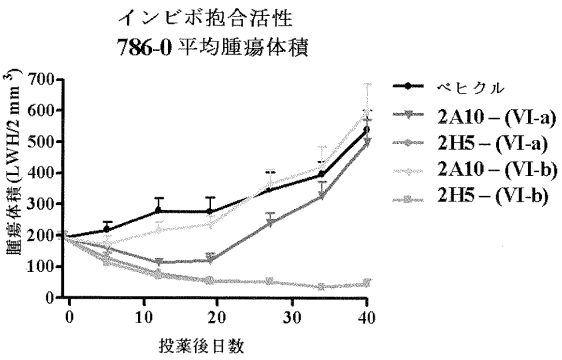
【図１３】

図１３



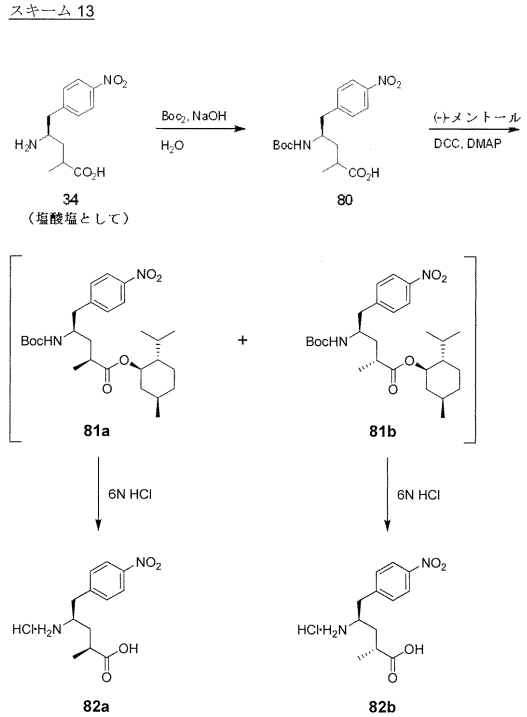
【図１４】

図１４



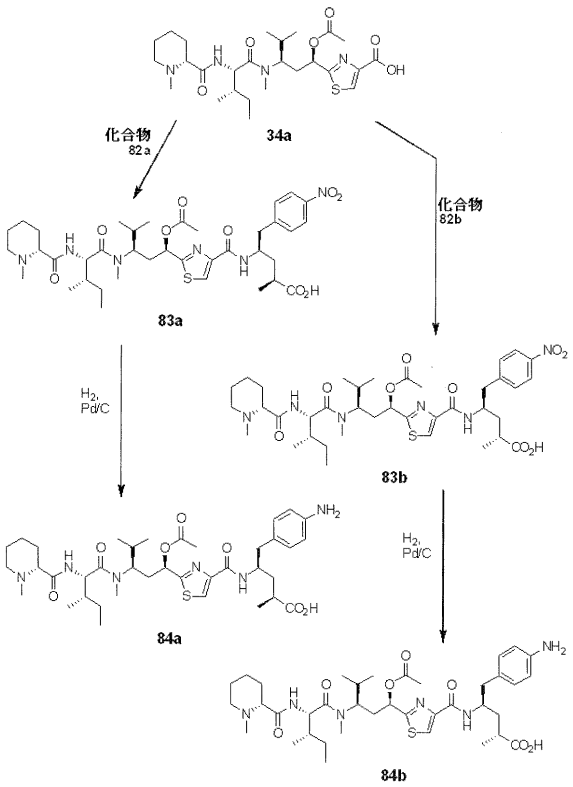
【図１５】

図１５



【図１６】

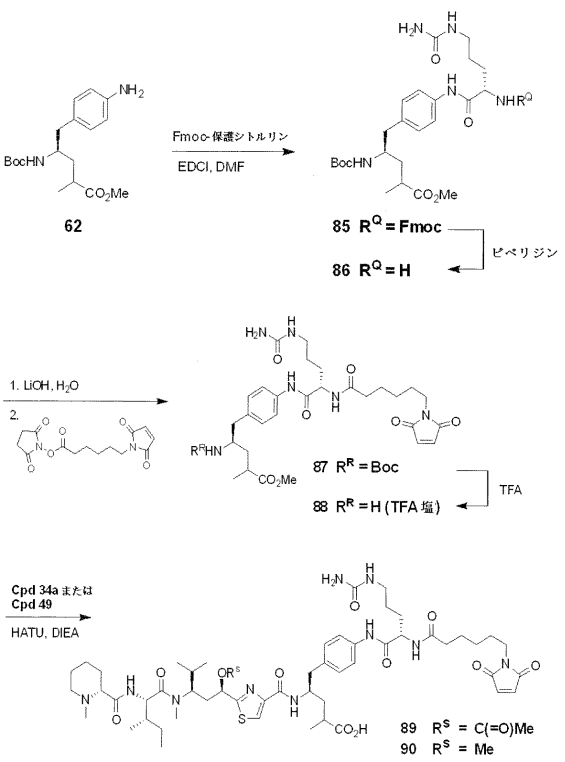
図１６



【図１７】

図１７

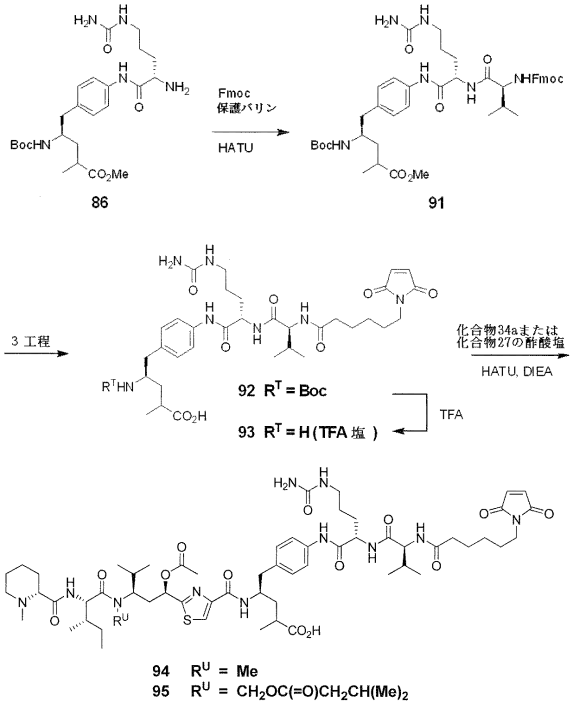
スキーム 15



【図１８】

図１８

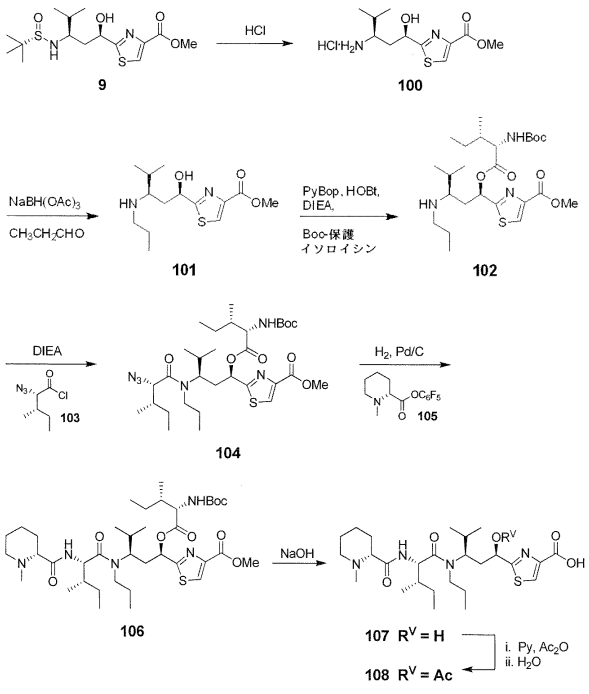
スキーム 16



【図１９】

図１９

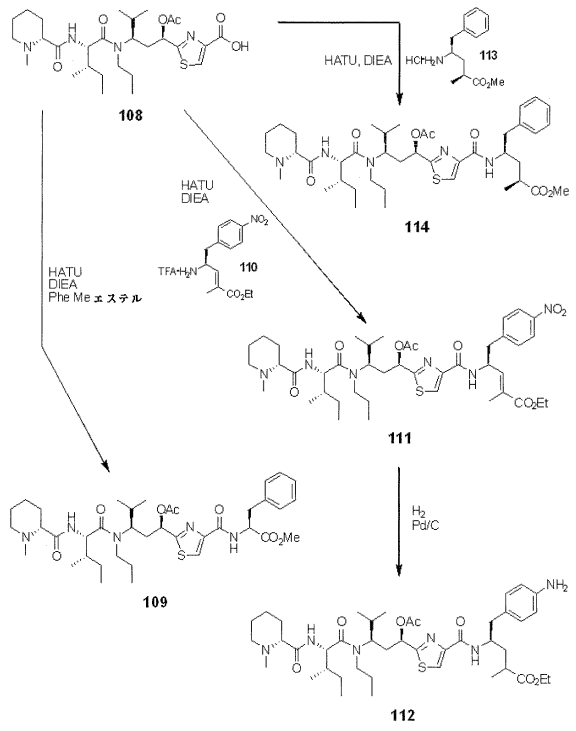
スキーム 17



【図２０－１】

図２０ａ

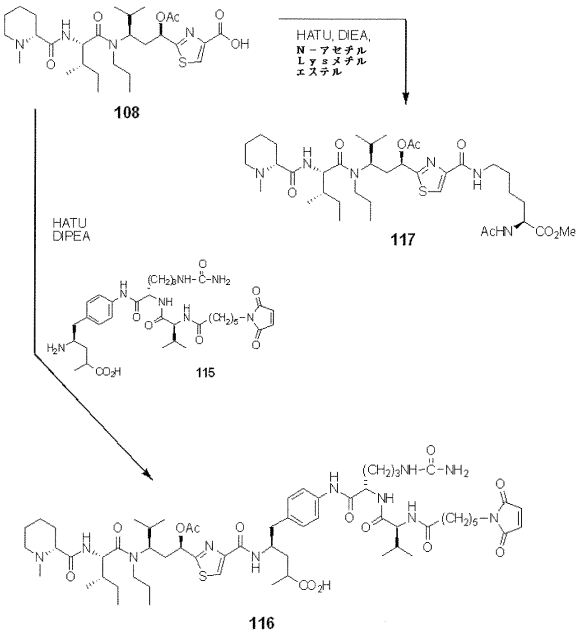
スキーム 18 (パート２の１)



【図２０－２】

図２０ｂ

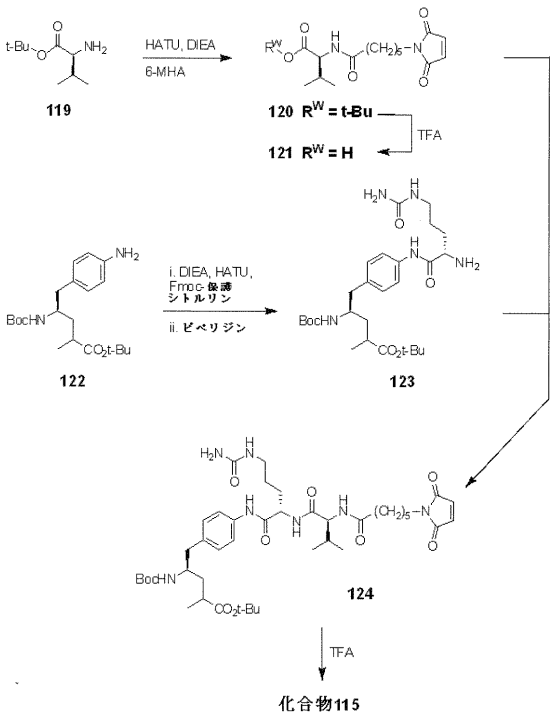
スキーム 18 (パート２の２)



【図２１】

図２１

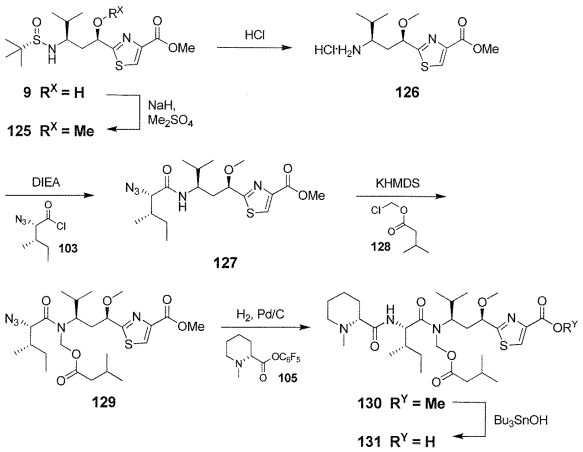
スキーム 19



【図２２】

図２２

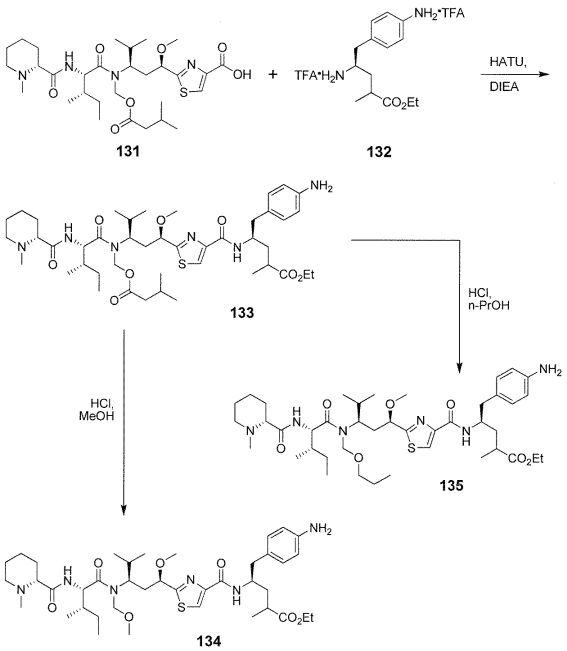
スキーム 20



【図２３】

図２３

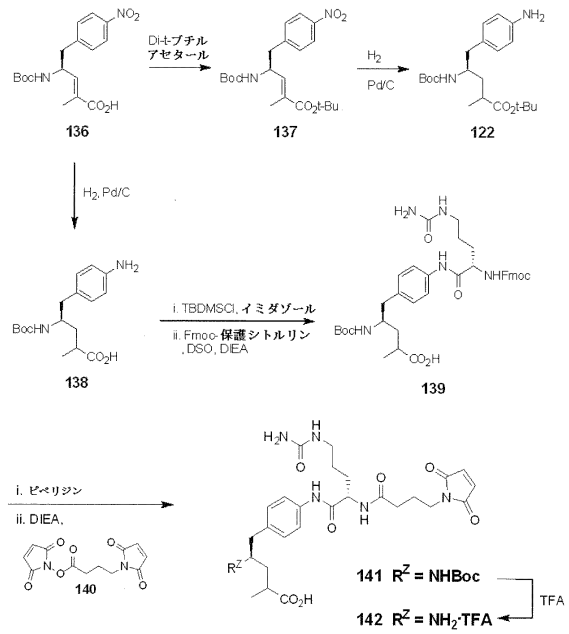
スキーム 21



【図２４】

図２４

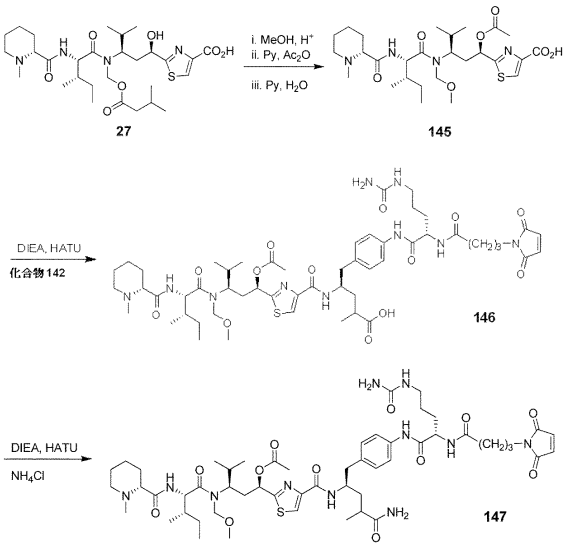
スキーム 22



【図２５】

図２５

スキーム 23



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ＦＩ
Ａ６１Ｐ 35/04 (2006.01) Ａ６１Ｐ 35/04

(72)発明者 チェン・ヘン
アメリカ合衆国９５０３５カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ５２１番、メダレックス インコーポレーティッド内
(72)発明者 コン・キアン
アメリカ合衆国９５０３５カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ５２１番、メダレックス インコーポレーティッド内
(72)発明者 サンジーブ・ギャングウォー
アメリカ合衆国９５０３５カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ５２１番、メダレックス インコーポレーティッド内
(72)発明者 キアン・チャン
アメリカ合衆国９５０３５カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ５２１番、メダレックス インコーポレーティッド内

審査官 荒木 英則

(56)参考文献 国際公開第２００８／１３８５６１（WO，Ａ1）
独国特許出願公開第１０２００４０３０２２７（ＤＥ，Ａ1）
国際公開第２０１０／０３４７２４（WO，Ａ1）
国際公開第２０１１／０５７８０５（WO，Ａ1）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ ５／００－ ５／０９７
Ｃ０７Ｄ ４１７／００－４１７／１４
Ａ６１Ｋ ３１／００－ ３１／８０
Ａ６１Ｋ ３８／００－ ３８／４２
Ａ６１Ｋ ３９／００－ ３９／４４
Ａ６１Ｐ １／００－ ４３／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）