

明 細 書

発明の名称：

新規環状ジヌクレオチド誘導体を含む抗体薬物コンジュゲート

技術分野

[0001] 本発明は、STINGアゴニスト活性を有する新規な構造を有する環状ジヌクレオチド誘導体と標的細胞に対する抗体とをリンカーを介して結合させた抗体薬物コンジュゲート、該抗体薬物コンジュゲートを含有する医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] STING (Stimulator of Interferon Genes) は、小胞体に局在する膜貫通型のアダプタータンパク質である（非特許文献1）。STINGは、哺乳動物における自然免疫活性化の中樞分子として機能しており、細菌やウイルスのような病原体の進入に対する防御の最前線を担っている。STINGの活性化は、複数の細胞質DNAセンサーが、外因性及び内因性のDNAを感知した際のシグナルによって引き起こされることが知られている。細胞質DNAセンサーの中では、cGAS (Cyclic GMP-AMP Synthase) が重要なDNAセンサーと考えられている。cGASがDNAを感知すると環状ジヌクレオチド (2', 3' -cGAMP) が産生され、この2', 3' -cGAMPがSTINGに直接結合し、STINGを活性化させる（非特許文献2）。活性化したSTINGはゴルジ体へと移動し、そこでTBK1 (Tank-binding kinase 1) の自己リン酸化を促す。自己リン酸化して活性化したTBK1は、IRF3 (Interferon regulatory factor 3) 転写経路（非特許文献3）及びNF κ B転写経路（非特許文献4）の両方を活性化し、インターフェロンやサイトカイン（I型IFN (Interferon)、IL-6 (Interleukin-6)、TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)）と呼

ばれる炎症性タンパク質の産生を増加させる。これらのタンパク質は、複雑なカスケードを通じて病原体や癌細胞を破壊するT細胞を含む獲得免疫系を始動させる。

[0003] 最近の研究により、STINGは微生物に対する宿主防御だけでなく、抗腫瘍免疫を促進することが示された。例えば、STING欠損マウスに免疫原性腫瘍を移植した場合、腫瘍は、野生型マウスやTRIF (Toll / Interleukin-1 (IL-1) receptor domain containing adaptor-inducing interferon- β) 欠損マウスよりも急速に増殖する。また、STING欠損マウスでは、TLR (Toll-like receptor)、MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88)、MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein) 欠損マウスとは異なり、腫瘍に対する自発的なCD8⁺T細胞のプライミングも消失した。これは細胞質DNA感知により始動するSTING経路が腫瘍増殖の制御に関与していることを示唆している（非特許文献5）。他の研究では、STINGが放射線治療（非特許文献6）又は抗CD47抗体療法（非特許文献7）の抗腫瘍効果に必要であることも示されている。放射線又は抗CD47抗体で処置した後の、死んだ腫瘍細胞由来のDNAは、樹状細胞の細胞質へと移動してcGAS-STING経路を活性化した後、IFN産生を誘導して自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする。この研究は、STING経路によって活性化された樹状細胞を介在するクロスプライミングが腫瘍に対する獲得免疫を引き起こすために重要であることを示唆している。

[0004] 血管破壊剤として知られているフラボノイド系低分子化合物DMXAAは、マクロファージのI型IFNを誘導するため、マウス腫瘍モデルにおいて、強力な抗腫瘍活性を有することが示された（非特許文献8）。DMXAAは前臨床での優れた抗腫瘍効果から、非小細胞肺癌の免疫療法薬として期待されていたが、ヒトの臨床試験は失敗した（非特許文献9）。最近の研究に

より、DMXAAはマウスのSTINGに対する特異的なアゴニストであり、ヒトのSTINGに種交差性が無いため、結合できないことが明らかにされた（非特許文献10）。DMXAAは、結果的にヒトでは無効であったが、マウスモデルにおける研究により、低分子薬がSTINGを介在して、効果的にCD8⁺T細胞をプライミングし、抗腫瘍免疫を増強できることが示唆された。

[0005] 別の低分子化合物として、環状ジヌクレオチド（Cyclic dinucleotide、CDN）は、担がんマウスに投与するとSTING介在による抗腫瘍免疫応答が増強して腫瘍増殖が著しく阻害され、マウスの生存率を改善することが示された（非特許文献11）。CDNは、細菌由来の標準的な二つの3′-5′リン酸結合を有するCDN（cyclic-di-GMP, cyclic-di-AMP, 3′, 3′-cGAMP）と、哺乳動物のcGASが産生する非標準的な2′-5′リン酸結合を有する混合結合型のCDN（2′, 3′-cGAMP）に分類される。最近の研究により、標準的なCDNよりも混合結合型のCDNの方が、多様なSTINGを普遍的に活性化可能であることが示されている（非特許文献12）。

[0006] 天然型のCDNは、多くの核酸分子のように血液中の核酸分解酵素によって速やかに分解されるため、そのままの形で投与することはできない。そのため、生体内でSTINGアゴニスト活性を有する合成低分子化合物が開発されている（例えば、特許文献1〜26）。

[0007] 現在、抗腫瘍剤として臨床試験が進められているSTINGアゴニストのMIW-815（ADU-S100、MLRR-S2CDA又はMLRR-CDA・2Na⁺と呼ばれることもある）は、腫瘍内に直接投与される。STINGアゴニストを腫瘍に直接投与する方法では、腫瘍内の限定した範囲にしか薬剤を投与できず、また、複数の遠隔転移腫瘍すべてに直接投与するのは困難であることから、治療可能な腫瘍が限定されてしまうという問題がある。非特許文献13には、MLRR-S2CDA投与により抗腫瘍効果が示されたことが記載されるが、腫瘍内投与のみであり、全身投与（

例えば、静脈内投与)による抗腫瘍効果は示されていない。非特許文献14には、STINGアゴニストのSB11285をマウス腫瘍モデルに静脈内投与すると抗腫瘍効果が示されたことが記載されるが、SB11285が具体的にどのような構造を有する化合物かは明らかにされていない。特許文献14には、免疫刺激化合物と抗体構築物とリンカーを含有するコンジュゲートが記載されているが、免疫刺激化合物としてSTINGアゴニストを用いたコンジュゲートの具体例は記載されていない。特許文献26には、特定の構造を有するCDNと抗体とをリンカーを介して結合させたコンジュゲートが記載されているが、コンジュゲートを*in vivo*で投与した実施例の記載がなく、コンジュゲートの抗腫瘍効果は確認されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：国際公開第2014/099824号
特許文献2：国際公開第2014/179335号
特許文献3：国際公開第2014/189805号
特許文献4：国際公開第2014/189806号
特許文献5：国際公開第2015/074145号
特許文献6：国際公開第2015/185565号
特許文献7：国際公開第2016/096714号
特許文献8：国際公開第2016/012305号
特許文献9：国際公開第2016/145102号
特許文献10：国際公開第2017/027646号
特許文献11：国際公開第2017/027645号
特許文献12：国際公開第2017/075477号
特許文献13：国際公開第2017/093933号
特許文献14：国際公開第2017/100305号
特許文献15：国際公開第2017/123669号
特許文献16：国際公開第2017/161349号

特許文献17：国際公開第2017/175147号

特許文献18：国際公開第2017/175156号

特許文献19：国際公開第2018/009466号

特許文献20：国際公開第2018/045204号

特許文献21：国際公開第2018/060323号

特許文献22：国際公開第2018/067423号

特許文献23：国際公開第2018/065360号

特許文献24：国際公開第2014/093936号

特許文献25：国際公開第2018/009648号

特許文献26：国際公開第2018/100558号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Nature 2008, 455, 674-678

非特許文献2：Mol. Cell, 2013, 51, 226-235

非特許文献3：Science 2015a, 347, aaa2630

非特許文献4：J. Virol. 2014, 88, 5328-5341

非特許文献5：Immunity 2014, 41, 830-842

非特許文献6：Immunity 2014, 41, 843-852

非特許文献7：Nat. Med. 2015, 21, 1209-1215

非特許文献8：J. Immunol. 1994, 153, 4684-4693

非特許文献9：J. Clin. Oncol. 2011, 29, 2965-2971

非特許文献10：J. Immunol. 2013, 190, 5216-5225

非特許文献11：Sci. Rep. 2016, 6, 19049

非特許文献12：Mol. Cell, 2015, 59, 891-903

非特許文献13：Cell Rep. 2015, 11, 1018-1030

非特許文献14：AACR Tumor Immunology and Immunotherapy、2017、Poster #A25

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 全身投与が可能であり、かつ、目的とする細胞や臓器（例えば、腫瘍部位）に特異的にSTINGアゴニストを送達することができる抗体薬物コンジュゲート及び該抗体薬物コンジュゲートを用いたSTINGアゴニスト活性が関連する疾患、例えば、免疫賦活化による治療が可能な疾患（例えば、がん）の治療剤及び／又は治療法の開発が望まれている。

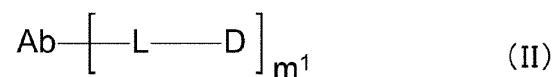
課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、上記の課題を解決するため、縮合三環性置換基を有することを特徴とする新規CDN誘導体と特定の抗体とをリンカーを介して結合させた抗体薬物コンジュゲートを見出し、該抗体薬物コンジュゲートを全身投与すると、抗原が発現している腫瘍で抗腫瘍効果が示されることを見出し、本発明を完成させた。

- [0012] すなわち本願発明は、以下に関するが、それらに限定されるものではない。

[1] 次式(II)：

[化1]



(式中、 m^1 は1から10の範囲であり、

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

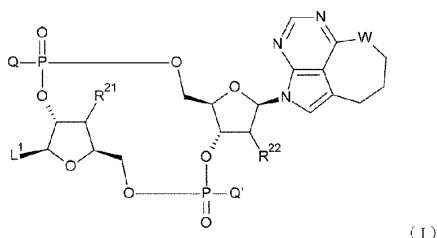
(ここで、抗体は、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、及び抗EGFR抗体からなる群から選択されるいずれかの抗体を示す)

Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、

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

Dは、次式（1）：

[化2]

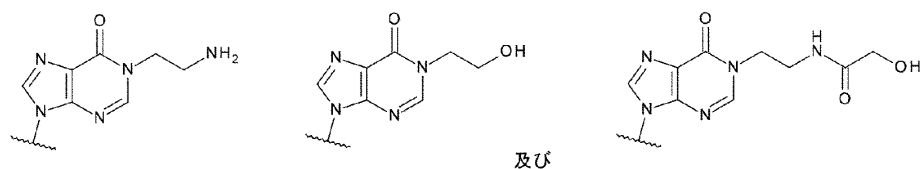


（ここで、

Lは、L¹に含まれる任意の-NH₂又はヒドロキシ基と結合し、

L¹は、以下の3式：

[化3]



（ここで、波線は置換位置を示す）

のいずれかの基を示し、

Q及びQ'は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はチオール基を示し、

R²¹及びR²²は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はフッ素原子を示し

、

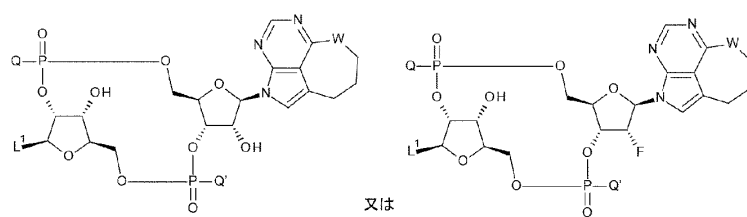
Wは、-NH-又は硫黄原子を示す）

で表される化合物を示す）

で表される抗体薬物コンジュゲート；

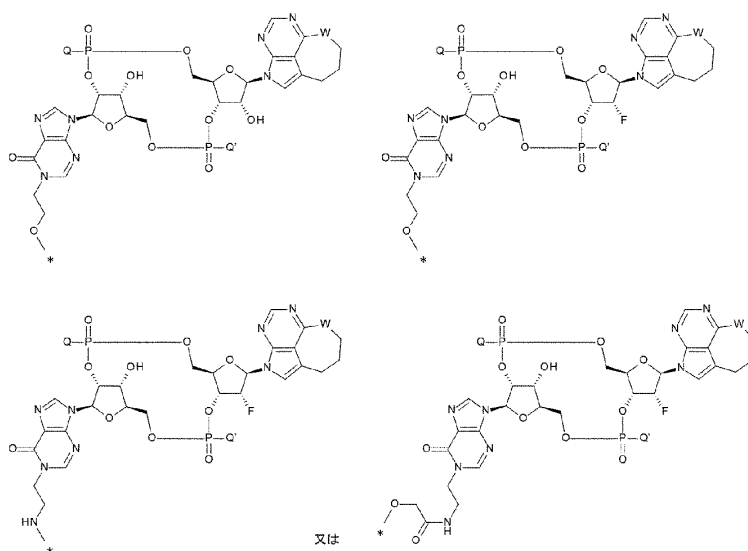
[2] Dが、以下の2式：

[化4]



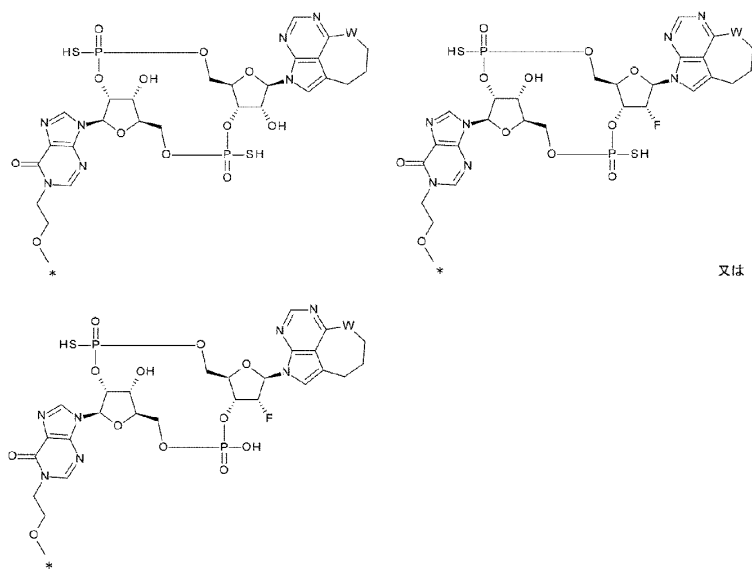
(ここで、 L^1 、 Q 、 Q' 及び W は、前に定義したとおりである)
 のいずれかで示される、[1]に記載の抗体薬物コンジュゲート；
 [3] Dが、以下の4式：

[化5]



(ここで、アステリスクは L と結合していることを示し、 Q 、 Q' 及び W は、前に定義したとおりである)
 のいずれかで示される、[1] 又は [2] に記載の抗体薬物コンジュゲート
 ；
 [4] Dが、以下の3式：

[化6]

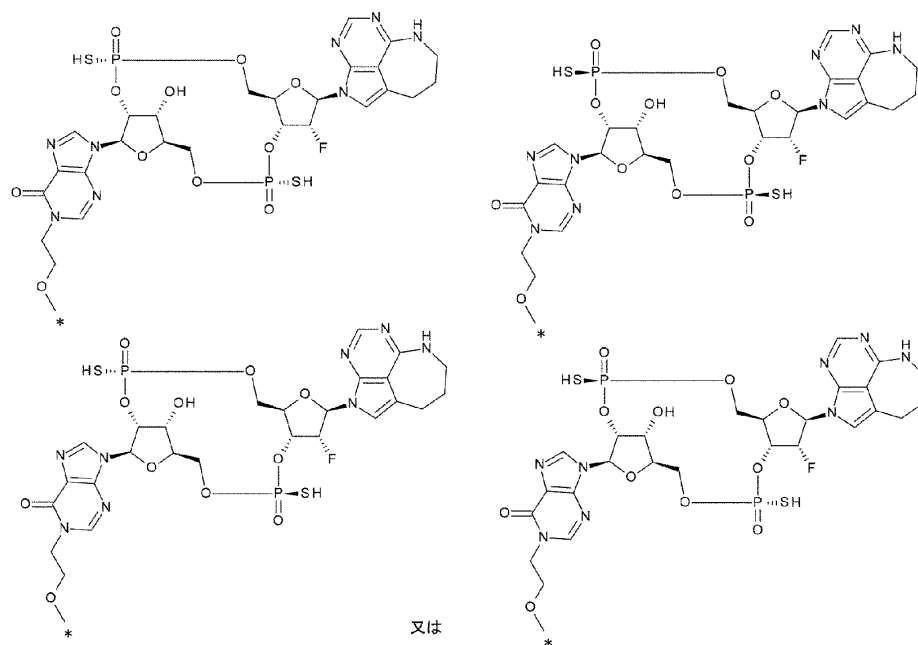


(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示し、Wは、前に定義したとおりである)

のいずれかで示される、[1]～[3]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[5] Dが、以下の3式：

[化8]

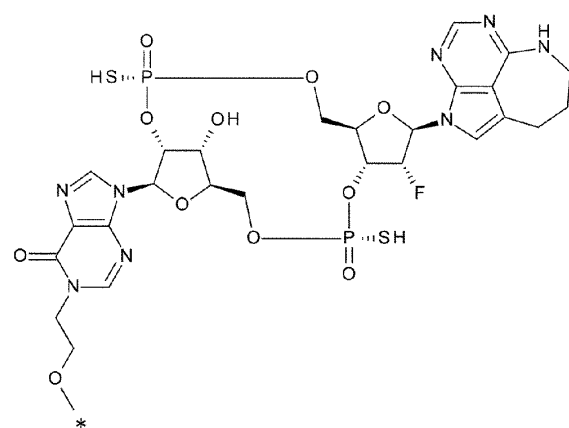


(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

のいずれかで示される、〔１〕～〔４〕のいずれか１項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[7] Dが、次式：

[化9]



(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)

のいずれかで示される、[1]～[3]又は[8]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[10] リンカーLが、 $-Lb-La-Lp-Lc-*$ で示され、

式中、アスタリスクは、薬物Dと結合していることを示し、

Lpは、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを示すか又は存在せず、

Laは、以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-CH_2-C(=O)-$ 、

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

$-C(=O)-$ 、

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

$-CH_2-C(=O)-$ 、

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

$^3-CH_2-C(=O)-$ 、

$-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$ 、及び、

$-(CH_2)n^9-C(=O)-$

(ここで、 n^2 は1～3の整数を示し、 n^3 は1～5の整数を示し、 n^4 は0～2の整数を示し、 n^9 は2～7の整数を示す)、

Lbは、LaとAbの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖を結合するスペーサー又はLaとAbのシステイン残基を結合するスペーサーを示し、並びに、

Lcは、 $-NH-CH_2-$ 、 $-NH-$ フェニル基 $-CH_2-O(C=O)-$ 又は $-NH-$ ヘテロアリール基 $-CH_2-O(C=O)-$ を示すか又は存在しない、

[1]～[9]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[11] Lcが $-NH-CH_2-$ である、[10]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[12] L_pが、-GGFG-、-GGPI-、-GGVA-、-GGFM-、-GGVCit-、-GGFCit-、-GGICit-、-GGPL-、-GGAQ-又は-GGPP-のいずれか一つである、[10]又は[11]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[13] L_pが、-GGFG-又は-GGPI-である、[12]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

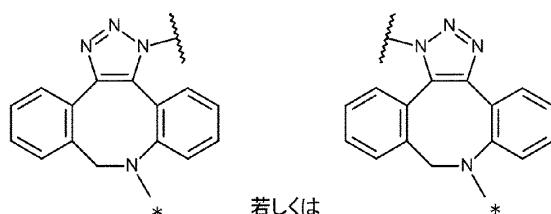
[14] L_aが、以下：

-C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₃-CH₂-C(=O)-、
 -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)₄-CH₂-C(=O)-、及び
 -(CH₂)₅-C(=O)-

からなる群から選択されるいずれか一つを示す、[10]～[13]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

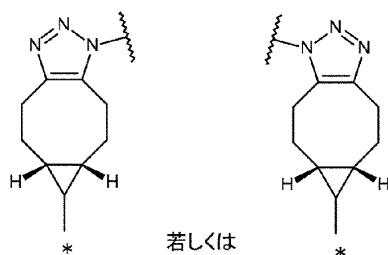
[15] L_bが、次式：

[化12]



又は

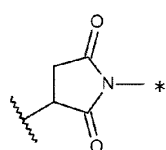
[化13]



(上記で示されるL bの構造式において、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)のいずれかで示される、[10]～[14]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[16] L bが、－(スクシンイミド－3－イル－N)－であり、
ここで、－(スクシンイミド－3－イル－N)－は、以下の構造式：

[化14]



を示し、

ここで、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線は抗体のシステイン残基の側鎖とチオエーテルを形成して結合していることを示す、[10]～[14]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[17] リンカーLが、－L b－L a－L p－L c－*で示され、

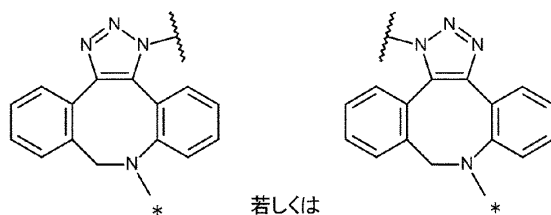
式中、アスタリスクは、薬物Dと結合していることを示し、

L pが、－GGFG－、又は－GGPI－であり、

L aが、－C(=O)－CH₂CH₂－C(=O)－を示し、

L bが、次式：

[化15]



(上記で示されるL bの構造式において、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)を示し、

L c が、 $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ を示す、[10]～[15]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[18] 抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から10の範囲である、[1]～[17]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[19] 抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、1から5の範囲である、[18]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

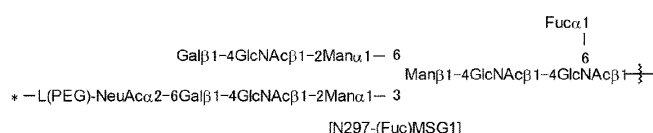
[20] 抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの平均薬物結合数が、3から5の範囲である、[19]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[21] 抗体が、抗体のAsn297に結合する糖鎖（N297糖鎖）からLに結合している、[1]～[20]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[22] N297糖鎖が、リモデリングされた糖鎖である、[21]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[23] N297糖鎖が、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)SGである、[21]又は[22]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[化16]



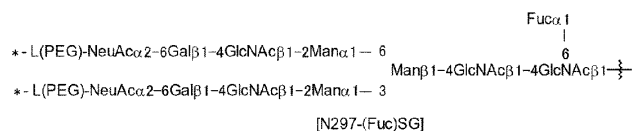
式中、波線は抗体のAsn297に結合していることを示し、

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

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

n^5 は 2 ～ 5 の整数である；

[化17]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

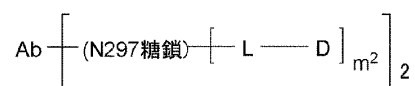
L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

n^5 は 2 ～ 5 の整数である；

[2 4] 次式：

[化18]



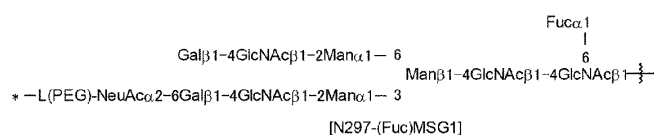
(式中、 m^2 は 1 又は 2 の整数を示し、

L は、A b の N 2 9 7 糖鎖と D を連結するリンカーであって、前に定義したとおりであり、

A b は、抗 C D 7 0 抗体、抗 T R O P 2 抗体、もしくは抗 E G F R 抗体又はそれらの抗体の機能性断片を示し、

A b の N 2 9 7 糖鎖は、次式で示される構造を有する N 2 9 7 - (F u c) M S G 1 又は N 2 9 7 - (F u c) S G であることを示し、

[化19]

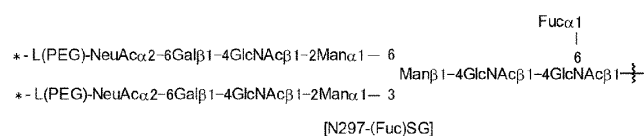


式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び n は 2 ~ 5 の整数を示し；

[化20]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

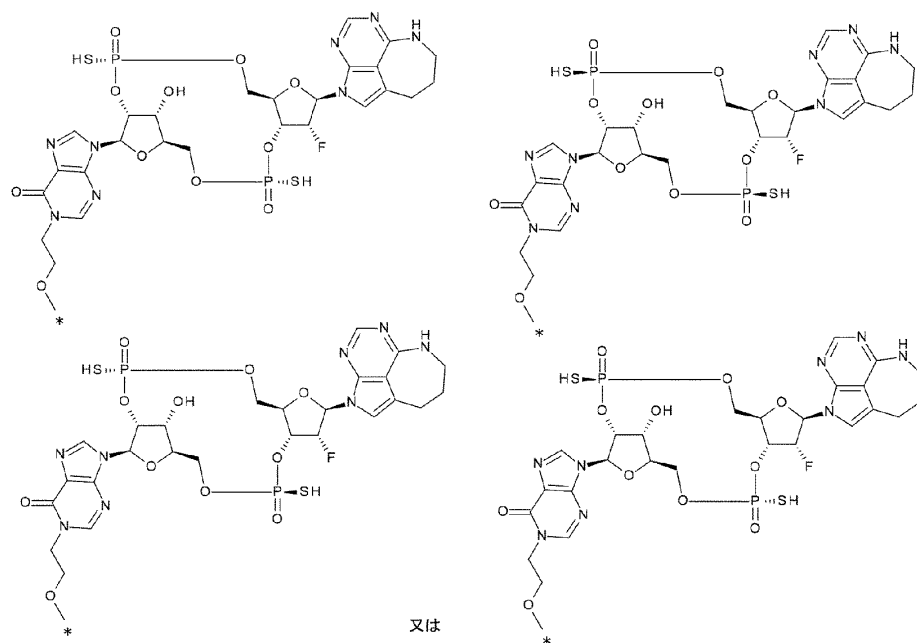
L (P E G) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

n は 2 ~ 5 の整数を示し、

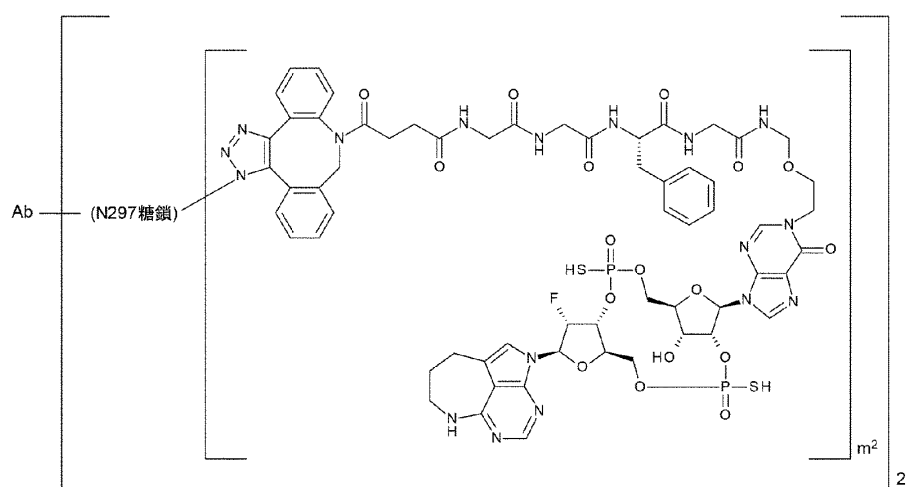
D は、以下の 4 式のいずれかで示され、

[化21]

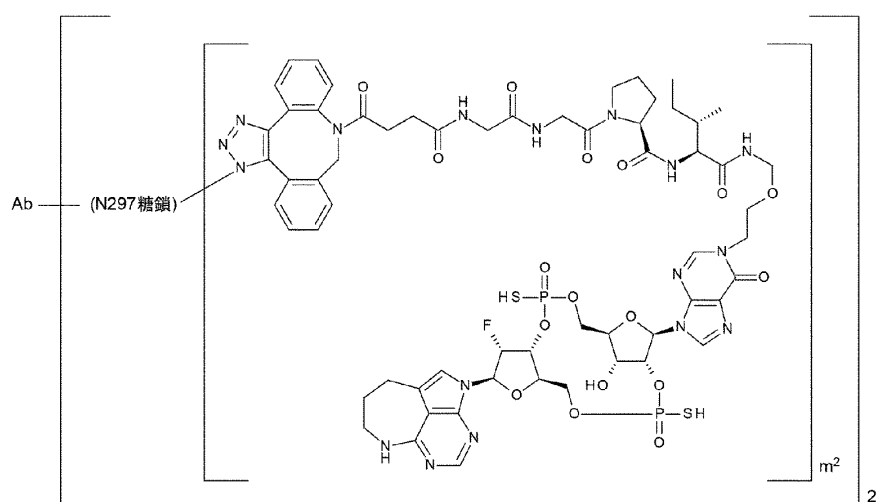


ここで、式中、アスタリスクはしと結合していることを示す) で示される、
 [2 1] ~ [2 3] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート ;
 [2 5] 次式 :

[化22]



もしくは



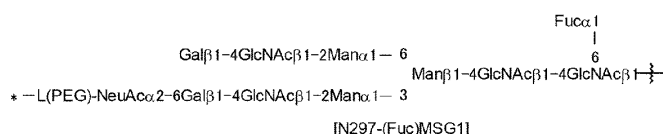
から選ばれ、

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

Abは、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、もしくは抗EGFR抗体又はそれらの抗体の機能性断片を示し、

AbのN297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであることを示し、

[化23]

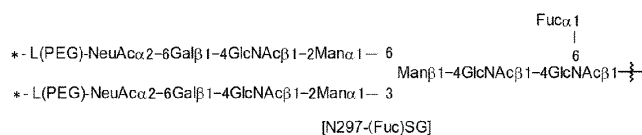


式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アステリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び n は 2~5 の整数を示し；

[化24]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

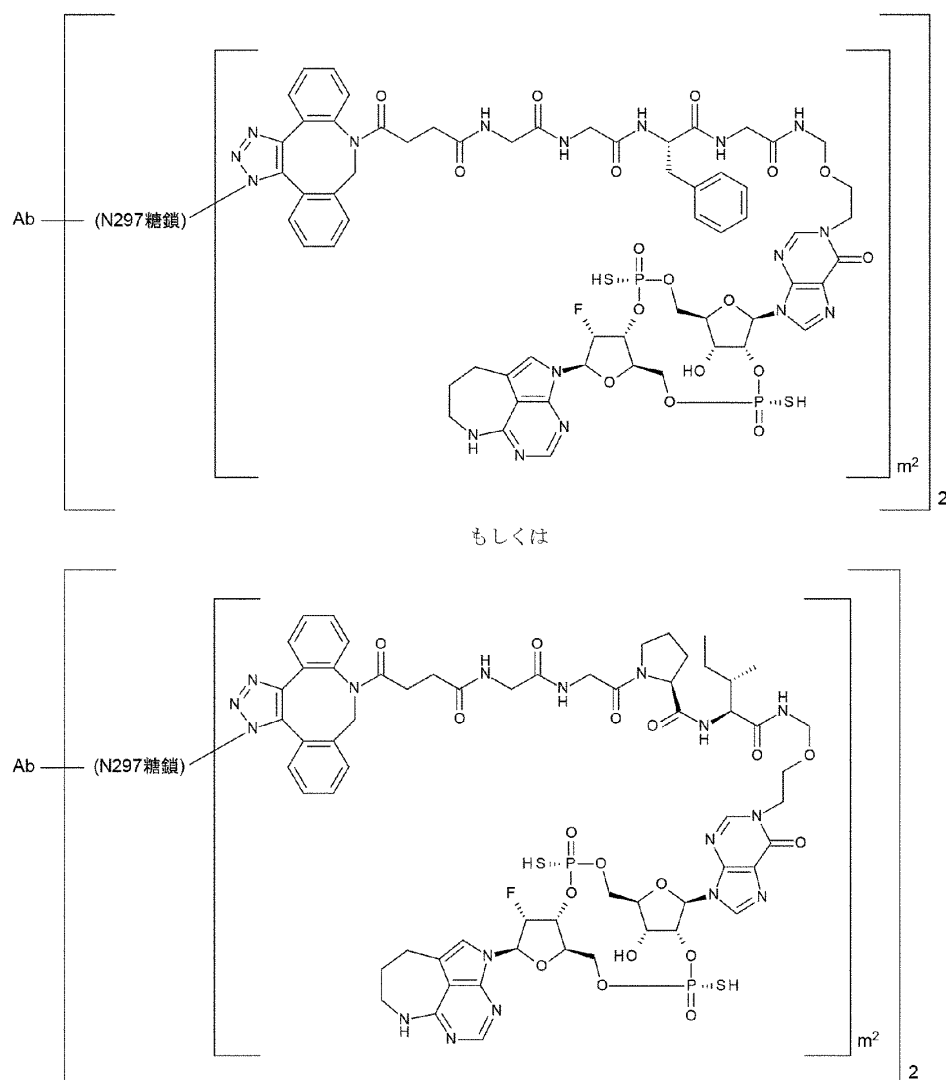
L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

n は 2~5 の整数を示す、[2 4] に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[2 6] 次式：

[化25]



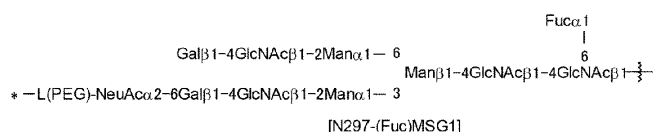
から選ばれ、

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

Abは、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、もしくは抗EGFR抗体又はそれらの抗体の機能性断片を示し、

AbのN297糖鎖は、次式で示される構造を有するN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)SGのいずれか一つであることを示し、

[化26]

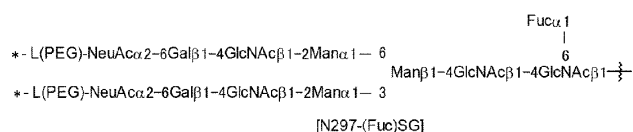


式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アスタリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び n^5 は 2 ~ 5 の整数を示し；

[化27]



式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

アスタリスクは、前記リンカー L における L b の 1, 2, 3-トリアゾール環上の 1 位又は 3 位の窒素原子と結合していることを示し、及び n^5 は 2 ~ 5 の整数を示す、[2 5] に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[2 7] 抗体が、抗 C D 7 0 抗体である、[1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[2 8] 抗体が、抗 T R O P 2 抗体である、[1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

〔29〕抗体が、抗EGFR抗体である、〔1〕～〔26〕のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

〔30〕抗体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は、配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体である、〔27〕に記載の抗体薬物コンジュゲート；

〔31〕抗体が、配列番号5に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号6に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は、配列番号7に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号8に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体である、〔28〕に記載の抗体薬物コンジュゲート；

〔32〕抗体が、配列番号9に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号10に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体、又は、配列番号11に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号12に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体である、〔29〕に記載の抗体薬物コンジュゲート；

〔33〕抗体が、配列番号1においてアミノ酸番号1乃至112に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号1乃至118に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体、又は、配列番号3においてアミノ酸番号1乃至108に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号4においてアミノ酸番号1乃至118に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体である、〔27〕に記載の抗体薬物コンジュゲート；

〔34〕

抗体が、配列番号5においてアミノ酸番号1乃至108に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号6においてアミノ酸番号1乃至121に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体、又は、配列番号7においてアミノ酸番号1乃至108に記載の

アミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 8 においてアミノ酸番号 1 乃至 1 2 1 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体である、[28] に記載の抗体薬物コンジュゲート；
[35]

抗体が、配列番号 9 においてアミノ酸番号 1 乃至 1 0 8 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 1 0 においてアミノ酸番号 1 乃至 1 1 9 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体、又は、配列番号 1 1 においてアミノ酸番号 1 乃至 1 0 8 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 1 2 においてアミノ酸番号 1 乃至 1 1 6 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体である、[29] に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[36]

抗体が、配列番号 3 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 3 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 3 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 3 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 4 0 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体、又は、配列番号 4 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 4 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 4 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 4 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 4 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体である、
[27] に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[37]

抗体が、配列番号 4 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 4 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 4 9 に記載の

アミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号50に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号51に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号52に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体、又は、配列番号53に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号54に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号55に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号56に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体である、

[28]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[38]

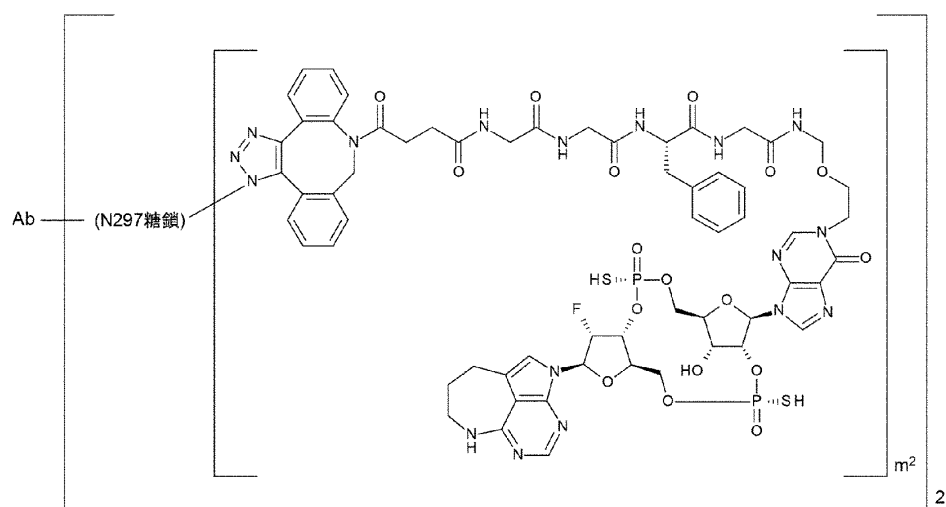
抗体が、配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号60に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号61に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体、又は、配列番号65に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号66に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号67に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号68に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号69に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号70に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体である、

[29]に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[39]

次式：

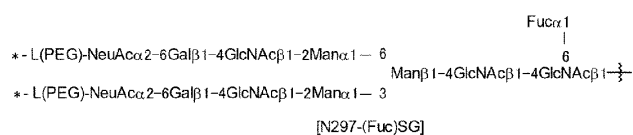
[化28]



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号5に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号6に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号7に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号8に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号9に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号10に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；
 配列番号11に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号12に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

A bのN297糖鎖は、次式：

[化29]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

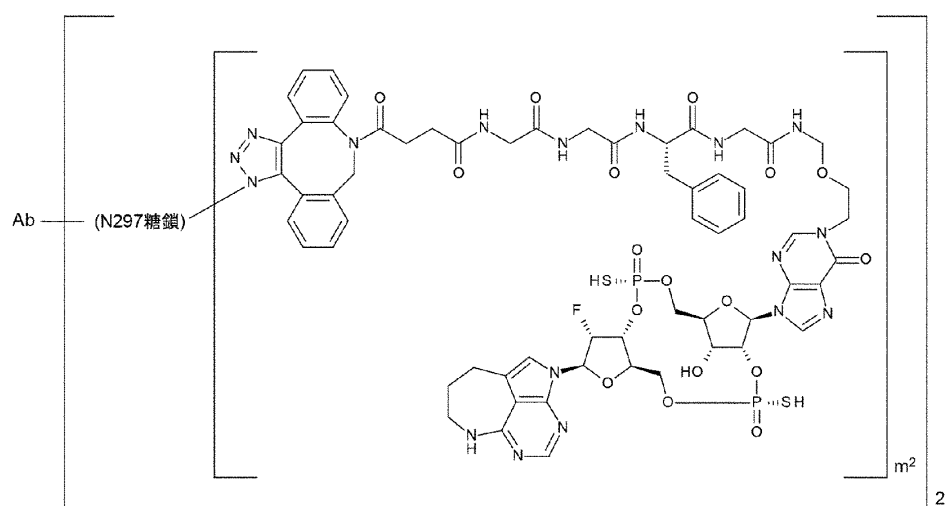
n^5 は3であり、及び

m^2 が2である) で表される、抗体薬物コンジュゲート；

[40]

次式：

[化30]



で表され、式中、A b は以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

配列番号1においてアミノ酸番号1乃至112に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号1乃至118に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号3においてアミノ酸番号1乃至108に記載のアミノ酸配列からなる

る軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 1 乃至 18 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 5 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 6 においてアミノ酸番号 1 乃至 121 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

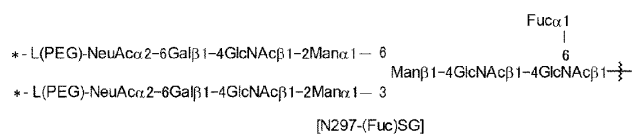
配列番号 7 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 8 においてアミノ酸番号 1 乃至 121 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 9 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 10 においてアミノ酸番号 1 乃至 119 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 11 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 12 においてアミノ酸番号 1 乃至 116 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

A b の N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化31]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (PEG) の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボ

キシル基とアミド結合していることを示し、

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

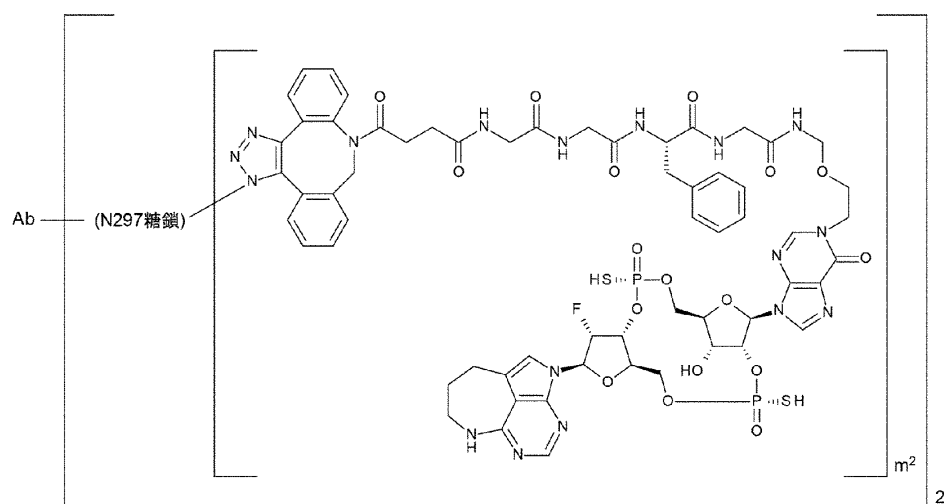
n^5 は3であり、及び

m^2 が2である) で表される、抗体薬物コンジュゲート；

[41]

次式：

[化32]



で表され、式中、Abは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

配列番号35に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号36に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号43に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号44に記載のアミノ

酸配列からなるCDRH1、配列番号45に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号47に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号48に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号49に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号50に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号51に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号52に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

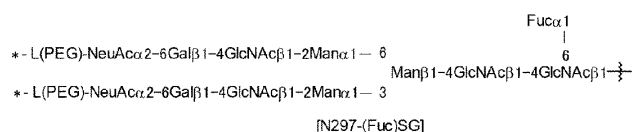
配列番号53に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号54に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号55に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号56に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号57に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号58に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号60に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号61に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号65に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号66に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号67に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号68に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号69に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号70に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

AbのN297糖鎖は、次式：

[化33]



(式中、波線は抗体のA s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該L (P E G) の右端のアミノ基がN 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の1-3鎖側及び1-6鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

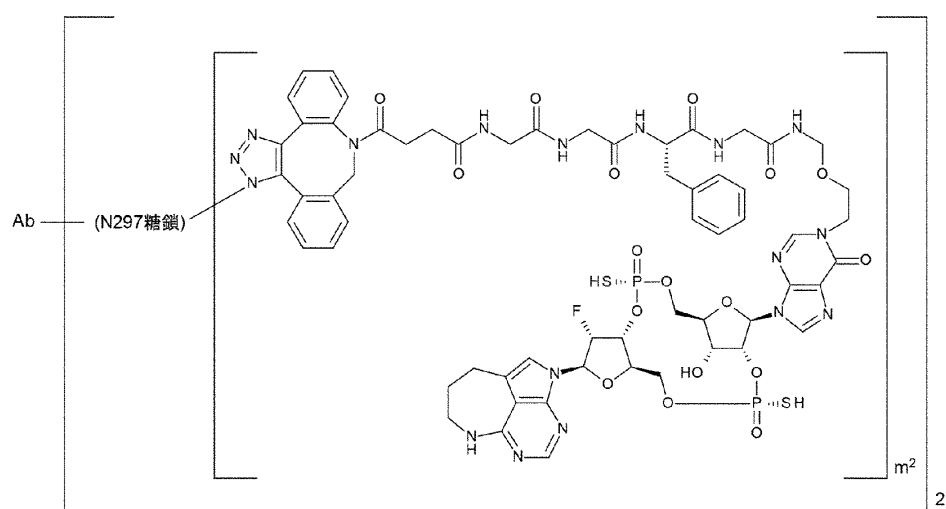
n^5 は3であり、及び

m^2 が2である) で表される、抗体薬物コンジュゲート；

[4 2]

次式：

[化34]



で表され、式中、A b は以下の群から選択されるいずれか一つを示し、

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 2 に記載のアミ

ノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

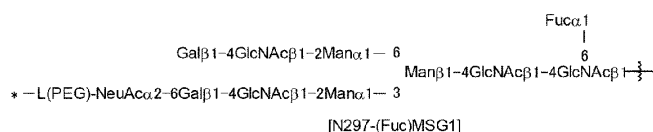
配列番号 7 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 8 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

配列番号 11 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖及び配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖を含む抗体；

A b の N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化35]



(式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側及び 1-6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

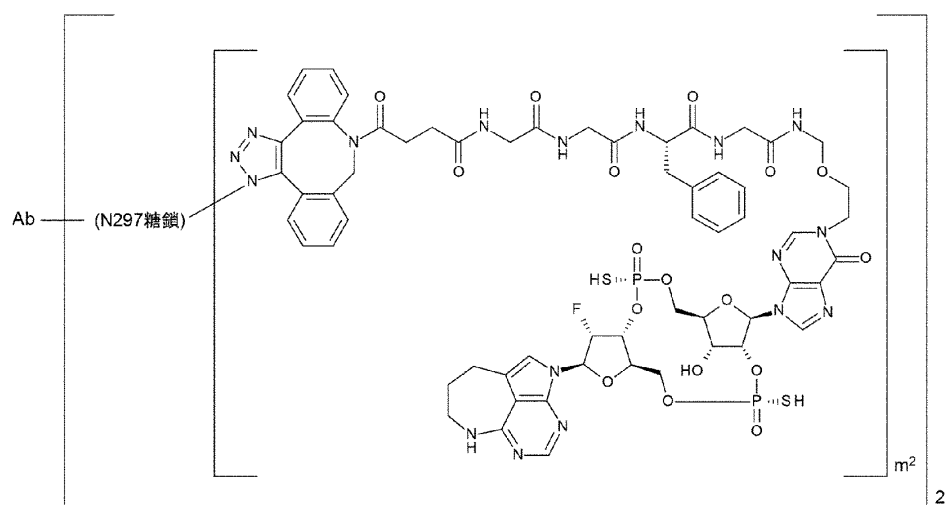
n^5 は 3 であり、及び

m^2 が 1 である) で表される、抗体薬物コンジュゲート；

[43]

次式：

[化36]



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
配列番号1においてアミノ酸番号1乃至112に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号2においてアミノ酸番号1乃至118に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 3 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 4 においてアミノ酸番号 1 乃至 118 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 5 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 6 においてアミノ酸番号 1 乃至 121 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

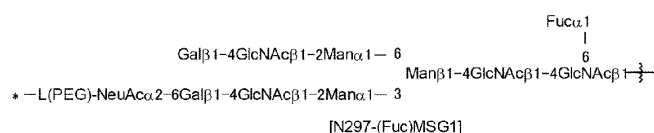
配列番号 7 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 8 においてアミノ酸番号 1 乃至 121 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 9 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 10 においてアミノ酸番号 1 乃至 119 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 11 においてアミノ酸番号 1 乃至 108 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、及び配列番号 12 においてアミノ酸番号 1 乃至 116 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖を含んでなる抗体；

Ab の N297 糖鎖は、次式：

[化37]



(式中、波線は抗体の Asn297 に結合していることを示し、

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

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

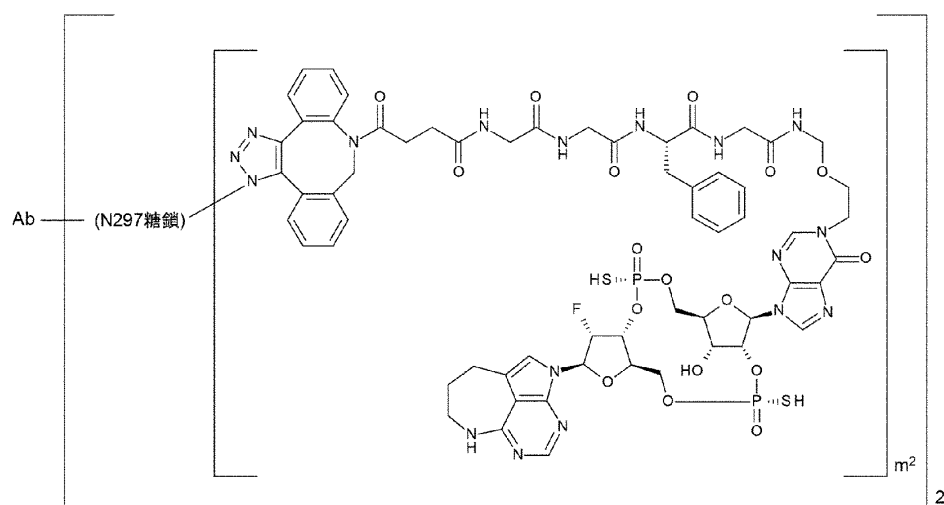
n^5 は 3 であり、及び

m^2 が 1 である) で表される、抗体薬物コンジュゲート；

[44]

次式：

[化38]



で表され、式中、A bは以下の群から選択されるいずれか一つを示し、
配列番号35に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号36に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号41に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号42に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号43に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号44に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号45に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号46に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号47に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号48に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号49に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号50に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号51に記載のアミノ酸配列からなるC

D R H 2、及び配列番号 5 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体；

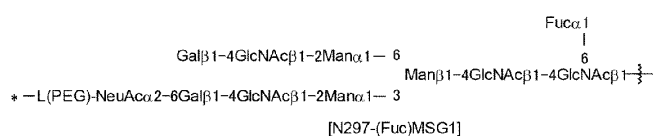
配列番号 5 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 5 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 5 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 5 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 5 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 5 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 6 0 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 6 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 6 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 6 3 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 6 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体；

配列番号 6 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 1、配列番号 6 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 2、及び配列番号 6 7 に記載のアミノ酸配列からなる C D R L 3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 6 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 1、配列番号 6 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 2、及び配列番号 7 0 に記載のアミノ酸配列からなる C D R H 3 を含む重鎖を含んでなる抗体；

A b の N 2 9 7 糖鎖は、次式：

[化39]



(式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖

の 1 - 3 鎖側及び 1 - 6 鎖側の両方の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

n^5 は 3 であり、及び

m^2 が 1 である) で表される、抗体薬物コンジュゲート；

[45] [1] ~ [44] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、STING アゴニスト；

[46] [1] ~ [44] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、医薬組成物；

[47] [1] ~ [44] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲートを含有する、抗腫瘍剤；

[48] 腫瘍が、肺がん、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍 (GIST)、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫又は肉腫である、[47] に記載の抗腫瘍剤；

[49] [1] ~ [44] のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート、[45] に記載の STING アゴニスト、[46] に記載の医薬組成物及び [47] 又は [48] に記載の抗腫瘍剤からなる群から選択されるいずれかを投与することを含む、がんの治療方法；

[50] がんが、肺がん、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍 (GIST)、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、有棘細胞がん、咽頭がん、舌がん、聴

器がん、胸腺がん、小腸がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫又は肉腫である、[49]に記載の方法；

[51] ヒト腎がん細胞株Caki-1細胞を皮下移植したBALB/c-muマウスにおいて抗体標的依存的な抗腫瘍効果を奏する、[27]、[30]、[33]又は[36]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート；

[52] [42]乃至[44]のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲートであって、下記(i)又は(ii)記載の動物において、抗体薬物コンジュゲートに含まれる抗体より強い抗腫瘍効果を奏する、抗体薬物コンジュゲート：

(i) 該抗体薬物コンジュゲートに含まれる抗体が結合する抗原上のエピトープ部位がヒト型に置換されたヒトマウスキメラ抗原の遺伝子を導入したマウス大腸がん細胞株CT26.WT(CRL2638)が皮下移植されたBALB/cマウス；

(ii) ヒト腎がん細胞株A-498(HTB-44)細胞が皮下移植されたBALB/c-muマウス、
に関する。

発明の効果

[0013] 本発明により、全身投与することができ、かつ、抗原が発現している腫瘍で抗腫瘍効果を示す、新規抗体CDN誘導体コンジュゲートが提供される。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の抗体薬物コンジュゲート((I)の分子)である、SG型糖鎖リモデリング抗体から得られた抗体薬物コンジュゲート(図1Aの(I)の分子)及びMSG型糖鎖リモデリング抗体から得られた抗体薬物コンジュゲート(図1Bの(I)の分子)を模式的に表したものである。(a)は薬物D、(b)はリンカーL、(c)はPEGリンカー(L(PEG))、(d)はN297糖鎖(ここで、白色の円はNeuAc(Sia)、白色の六角形はMan、黒色の六角形はGlcNAc、白色のひし形はGal、

及び白色の逆三角形はF u c)をそれぞれ表す。白色の五角形は、リンカーL由来のアルキンとP E Gリンカー由来のアジド基が反応して生成したトリアゾール環を表す。Y字型は、抗体A bを表す。P E Gリンカーは、非還元末端に位置するシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合を介して連結している。このような表示方法は、特に言及がない限り、本明細書の全体を通じて適用される。

[図2]本発明の抗体薬物コンジュゲートの製造中間体である、(F u c α 1, 6) G l c N A c-抗体(図2 Aの(I I I)の分子)、S G型糖鎖リモデリング抗体(図2 Bの(I V)の分子)、及びM S G型糖鎖リモデリング抗体(図2 Cの(I V)の分子)の構造を示す模式図である。全ての図において、Y字型は図1と同様に抗体A bを表す。図2 Aにおいて、(e)は、F u cの1位と、G l c N A cの6位において α グリコシド結合した二糖からなるN 2 9 7糖鎖を示す。図2 B及びCにおいて、(d)は図1と同様のN 2 9 7糖鎖を表し、(f)はアジド基を有するP E Gリンカーであり、末端にリンカーLとの結合に供されるアジド基を表す。アジド基を有するP E Gリンカーの結合様式は、図1のP E Gリンカーと同様である。

[図3]動物細胞で産生された抗体からS G型糖鎖リモデリング抗体及びM S G型糖鎖リモデリング抗体を製造する工程の模式図である。図中の分子(I I I)及び(I V)は、図2と同様に、(F u c α 1, 6) G l c N A c-抗体及びS G型糖鎖リモデリング抗体又はM S G型糖鎖リモデリング抗体をそれぞれ表す。(V)の分子は動物細胞で産生された抗体であり、N 2 9 7糖鎖が不均一な分子の混合物である。図3 Aは、(V)の不均一なN 2 9 7糖鎖を、E n d o Sのような加水分解酵素で処理することで、均一な(F u c α 1, 6) G l c N A c-抗体(I I I)が作製される工程を示す。図3 Bは、抗体(I I I)のN 2 9 7糖鎖のG l c N A cに対して、E n d o S D 2 3 3 Q/Q 3 0 3 L変異体のような糖転移酵素を用いて、S G型糖鎖ドナー分子を糖鎖転移させることで、(I V)のS G型糖鎖リモデリング抗体が作製される工程を示す。図3 Cは、図3 Bと同様に、抗体(I I I)に対

して、MSG型糖鎖ドナー分子を糖鎖転移させることで（I V）のMSG型糖鎖リモデリング抗体が作製される工程を示す。ここで用いられるSG型糖鎖ドナー分子及びMSG型糖鎖ドナー分子は、各々の非還元末端のシアル酸がアジド基を有するPEGリンカーで修飾されたものであり、作製されるSG型N297糖鎖リモデリング抗体及びMSG型N297糖鎖リモデリング抗体においても、図2B及びCで示したとおり、非還元末端のシアル酸が同様の修飾を受けたものとなる。

[図4]抗CD70抗体1の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号1）及び重鎖のアミノ酸配列（配列番号2）を示す（本明細書において、「抗CD70抗体1」は「改変抗CD70抗体1」とも称する）。

[図5]抗CD70抗体2の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号3）及び重鎖のアミノ酸配列（配列番号4）を示す（本明細書において、「抗CD70抗体2」は「改変抗CD70抗体2」とも称する）。

[図6]抗TROP2抗体1の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号5）及び重鎖のアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

[図7]抗TROP2抗体2の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号7）及び重鎖のアミノ酸配列（配列番号8）を示す（本明細書において、「抗TROP2抗体2」は「改変抗TROP2抗体」とも称する）。

[図8]抗EGFR抗体1の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号9）及び重鎖のアミノ酸配列（配列番号10）を示す（本明細書において、「抗EGFR抗体1」は「改変抗EGFR抗体1」とも称する）。

[図9]抗EGFR抗体2の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号11）及び重鎖のアミノ酸配列（配列番号12）を示す（本明細書において、「抗EGFR抗体2」は「改変抗EGFR抗体2」とも称する）。

[図10]（a）ヒトSTING 野生型のアミノ酸配列（配列番号13）、（b）ヒトSTING REF変異型（R232H）のアミノ酸配列（配列番号15）、及び（c）ヒトSTING HAQ変異体（R71H, G230A, R293Q）のアミノ酸配列（配列番号17）を示す。

[図11]抗TROP2抗体2、抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート（1）、抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート（2）、および抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート（3）による、TROP2発現細胞におけるSTINGアゴニスト活性を示す。

[図12]化合物34a、抗CD70抗体1、抗CD70抗体2、抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート（1）、および抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（1）による、CT26、WT及びCT26、WT-hCD70細胞株とマウス骨髄由来樹状細胞との共培養アッセイ系における活性を示す。

[図13]抗TROP2抗体1及び抗TROP2抗体1-CDNコンジュゲート（1）の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白逆三角線は、参考例5で作製した抗TROP2抗体1に実施例1の化合物6bをコンジュゲートさせた抗TROP2抗体1-CDNコンジュゲート（1）投与群、白丸線は抗TROP2抗体1投与群を示す。縦軸は腫瘍体積（ mm^3 ）、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図14]抗TROP2抗体2及び抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート（1）の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白逆三角線は、参考例6で作製した抗TROP2抗体2に実施例2の化合物34aをコンジュゲートさせた抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート（1）投与群、白丸線は抗TROP2抗体2投与群を示す。縦軸は腫瘍体積（ mm^3 ）、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図15]抗EGFR抗体1、抗EGFR抗体2、抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。参考例7で作製した抗EGFR抗体1に実施例2の化合物34aをコンジュゲートさせた、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（1）及び参考例8で作製した抗EGFR抗体2に実施例2の化合物34aをコンジュゲートさせた、抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート（1）の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白三角線は抗EGFR抗体1投与群、黒三角線は抗

EGFR抗体1-CDNコンジュゲート(1)投与群、白丸線は抗EGFR抗体2投与群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート(1)投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図16]抗CD70抗体1のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号35)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号36)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号37)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号38)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号39)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号40)を示す。

[図17]抗CD70抗体2のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号41)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号42)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号43)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号44)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号45)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号46)を示す。

[図18]抗TROP2抗体1のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号47)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号48)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号49)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号50)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号51)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号52)を示す。

[図19]抗TROP2抗体2のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号53)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号54)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号55)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号56)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号57)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号58)を示す。

[図20]抗EGFR抗体1のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号59)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号60)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号61)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号62)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号63)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号

64)を示す。

[図21]抗EGFR抗体2のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号65)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号66)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号67)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号68)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号69)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号70)を示す。

[図22]抗CD70抗体1、抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート(1)及び抗CD70抗体2、抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート(1)の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はピヒクル群、白三角線は抗CD70抗体1投与群、白逆三角線は抗CD70抗体2投与群、白ひし形線は抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート(1)投与群、白丸線は抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート(1)投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図23]抗CD70抗体2、抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート(2)の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はピヒクル群、白三角線は抗CD70抗体2投与群、白逆三角線は抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート(2)投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

[図24]抗EGFR抗体1、化合物34a、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート(2)の静脈内投与による抗腫瘍効果を示す。図中の黒四角線はピヒクル群、白三角線は抗EGFR抗体1投与群、白ひし形線は化合物34a投与群、白四角線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート(2)投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、STINGアゴニスト活性を有する新規CDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲート及びその使用に関する。該新規CDN誘導体は、STINGアゴニスト活性を有し、免疫細胞を賦活化してインターフェロンやサイトカインの産生を誘導する。また、該新規CDN誘導体は、当該免疫細胞

の賦活化により抗腫瘍効果を発揮する。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、該CDN誘導体と標的細胞（例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞）を認識し結合できる抗体とを任意のリンカーを介して連結することにより作製され、全身投与し得る。全身投与の具体例としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下の経路が挙げられる。

[0016] STING (Stimulator of Interferon Genes) とは、小胞体に局在する膜貫通型のアダプタータンパク質である。STINGには、先天的な多型が高い頻度で存在することが知られている (PLoS One、2013 Oct、21、8(10)、e77846)。STING変異型としては、例えば、232番目のアミノ酸がアルギニン(R) からヒスチジン(H) に変異したR232H変異や、71番目のアルギニン(R) がヒスチジン(H) に、230番目のグリシン(G) がアラニン(A) に、293番目のアルギニン(R) がグルタミン(Q) に変異したHAQ変異が知られている。このようなSTINGの多型では、STINGアゴニスト刺激により誘導されるサイトカイン産生量等の応答の強さに違いがあることが知られている (Genes and Immunity、2011、12、263-269)。そのため、ヒトにおいて安定してSTINGアゴニストが作用するためには、各STINGの型に対して活性を有することが望ましい。

[0017] 本明細書において、「がん」、「癌」及び「腫瘍」は同じ意味に用いている。

[0018] 本発明において、「免疫賦活化」とは、何らかの形で、単球、マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞、NK細胞、好中球等の抗腫瘍免疫に関与する免疫細胞の活性化を引き起こすことをいい、例えばサイトカイン及びケモカインの産生、免疫活性化マーカーの発現上昇、免疫抑制性マーカーの発現低下、細胞内シグナル伝達系のリン酸化等の変化、遺伝子発現の変化等、あらゆる免疫細胞の構造や機能上の変化を引き起こすことをいう。また、腫瘍細胞が抗腫瘍免疫を誘導する変化を引き起こすことも含み、例えば免疫細胞

胞を賦活化又は遊走を誘導するサイトカイン及びケモカインの産生、免疫細胞に対する感受性亢進等を誘導することをいう。

[0019] 本発明において、「抗腫瘍効果」とは、薬物により腫瘍細胞に対して直接的又は間接的に影響することで、腫瘍の減少又は退縮を誘導することをいう。例えば、腫瘍細胞に対して薬物が直接的な傷害を与える、腫瘍細胞が薬物の刺激によって抗腫瘍免疫を賦活化する、腫瘍細胞へ送達された薬物が細胞外へ放出等され腫瘍細胞周辺の抗腫瘍免疫が賦活化すること等により、腫瘍細胞数の減少、及び傷害、又は腫瘍の退縮を引き起こすことを抗腫瘍効果という。

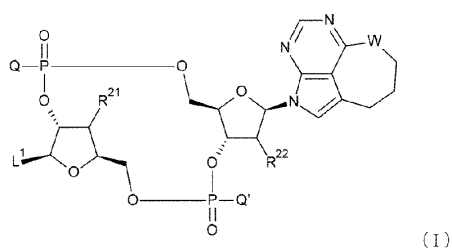
[0020] 本発明において、「細胞傷害活性」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を引き起こすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷を引き起こすことをいう。

[0021] 本発明において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

[0022] <1. 新規CDN誘導体>

新規CDN誘導体は、次式(I)：

[0023] [化40]

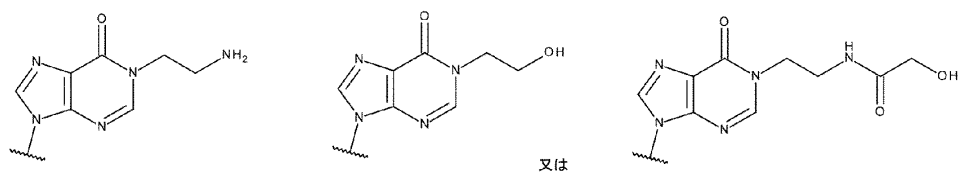


で示される構造を有する。

[0024] L¹は、以下の3式のいずれかで表される基

[0025]

[化41]



である。

Q及びQ'は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はチオール基を示す。好ましくは、Q及びQ'は、ともにチオール基である。

[0026] R²¹及びR²²は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基又はフッ素原子を示す。R²¹は、好ましくは、ヒドロキシ基である。R²²は、好ましくは、フッ素原子である。

[0027] Wは、—NH—又は硫黄原子である。Wは、好ましくは、—NH—である。

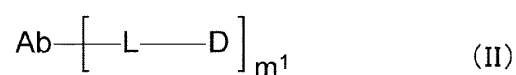
[0028] 該新規CDN誘導体の製造方法は、後述する<3. 製造方法>に記載する。

[0029] <2. 抗体薬物コンジュゲート>

本発明の抗体薬物コンジュゲートは、前述の新規CDN誘導体と標的細胞（例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞）を認識し結合できる抗体とが任意のリンカーを介して連結された抗体薬物コンジュゲートとして全身投与が可能である。

[0030] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、次式（ⅠⅠ）：

[0031] [化42]



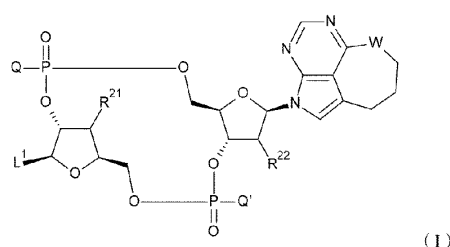
で示される。m¹は1から10の範囲であり、抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数を示す。Abは、抗体又は該抗体の機能性断片を示し、Lは、AbとDを連結するリンカーを示し、Dは上述した新規CDN誘導体（本明細書中、新規CDN誘導体が抗体薬物コンジュゲートの

一部として使用される場合、単に「薬物」とも称する)を示す。

[0032] 薬物Dは、免疫細胞を賦活化する活性、具体的には、STINGアゴニスト活性を有する化合物である。薬物Dは、リンカーの一部又は全部が標的細胞(例えば、腫瘍細胞又は免疫細胞)内で切断されると、本来の構造で遊離し、免疫賦活化効果が発揮される。免疫細胞に対する標的細胞の感受性亢進又は標的細胞を介した免疫細胞の賦活化により、目的の機能が発揮される。目的の機能としては、STINGアゴニスト活性に関連する機能であれば特に限定されないが、好ましくは、抗腫瘍活性である。すなわち、腫瘍を標的とする抗体(例えば、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、抗EGFR抗体)に任意のリンカーを介して連結された薬物Dは、標的の細胞又は組織に送達され、リンカーの一部又は全部が切断され、免疫細胞に対する標的細胞の感受性亢進又は標的細胞を介した免疫細胞の賦活化(例えば、インターフェロンやサイトカインの産生)を通じて抗腫瘍効果を発揮する。

[0033] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに結合される薬物Dは、次式(1)：

[0034] [化43]

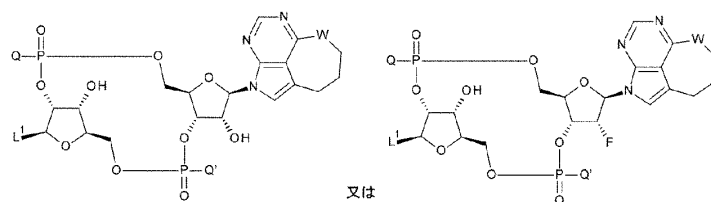


(ここで、 L^1 、 Q 、 Q' 、 R^{21} 、 R^{22} 及び W は、上記<1. 新規CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の2式：

[0035]

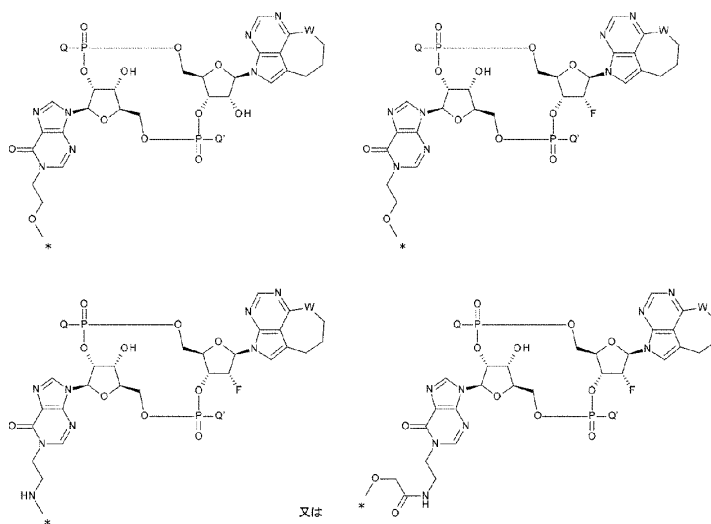
[化44]



(ここで、 L^1 、 Q 、 Q' 、及び W は、上記<1. 新規CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

[0036] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の4式：

[0037] [化45]

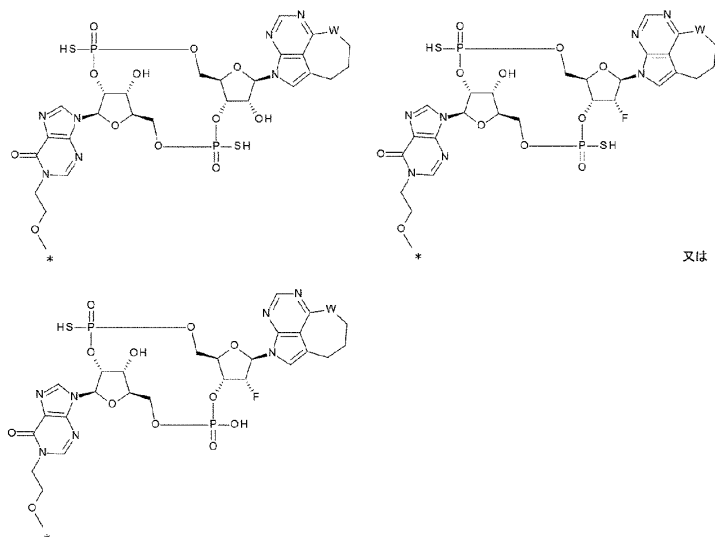


(ここで、アスタリスクは L と結合していることを示し、 Q 、 Q' 、及び W は、上記<1. 新規CDN誘導体>で規定したとおりである)で示される。

[0038] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の3式：

[0039]

[化46]

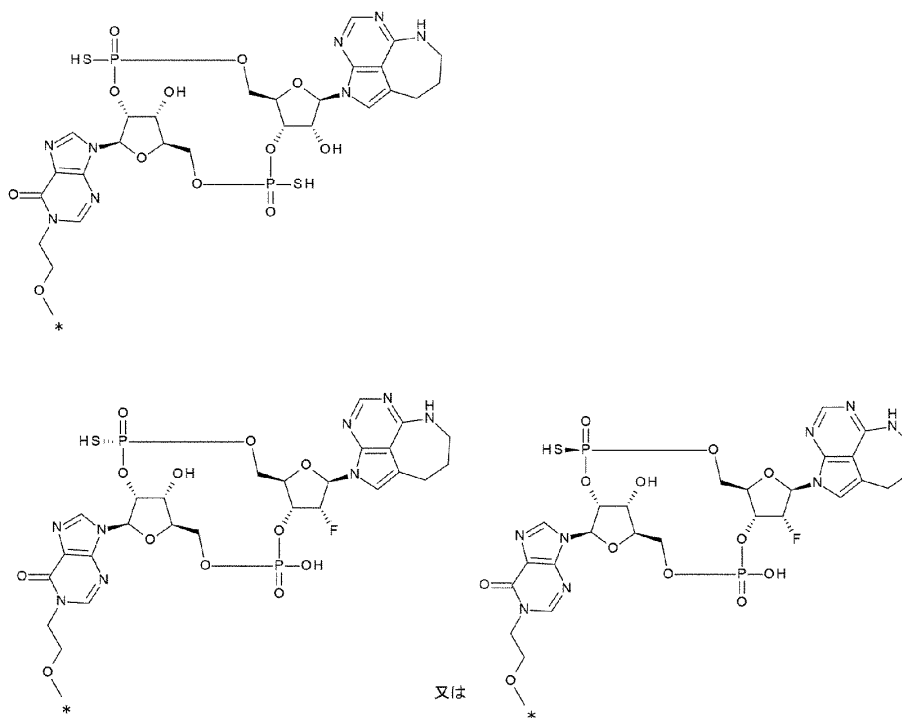


（ここで、アスタリスクはLと結合していることを示し、Wは、上記<1. 新規CDN誘導体>で規定したとおりである）で示される。

[0040] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の3式：

[0041]

[化47]



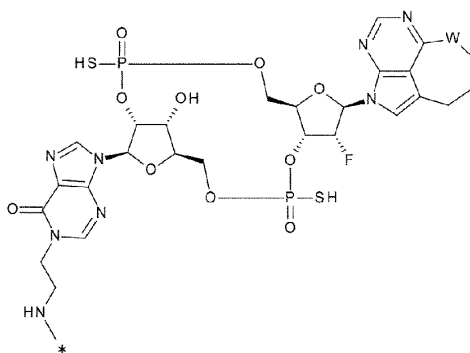
(ここで、アスタリスクはLと結合していることを示す)で示される。

[0042] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の4式：

[0043]

は、以下の式：

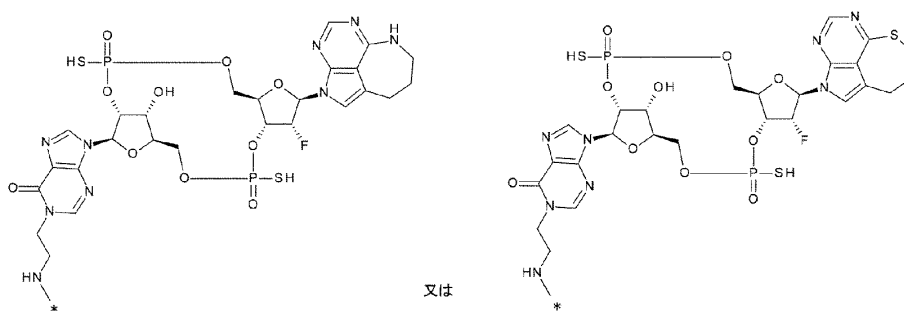
[0047] [化50]



（ここで、アステリスクはLと結合していることを示し、Wは、上記<1. 新規CDN誘導体>で規定したとおりである）で示される。

[0048] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の2式：

[0049] [化51]

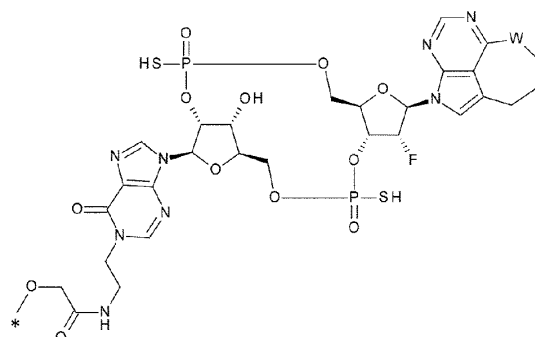


（ここで、アステリスクはLと結合していることを示す）で示される。

[0050] また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の式：

[0051]

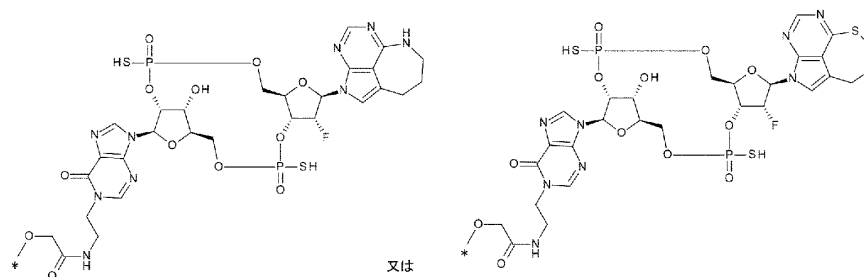
[化52]



（ここで、アステリスクはLと結合していることを示し、Wは、上記＜1. 新規CDN誘導体＞で規定したとおりである）で示される。

また、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物Dは、好ましくは、以下の2式：

[0052] [化53]



（ここで、アステリスクはLと結合していることを示す）で示される。

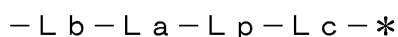
[0053] ＜2. 1. リンカー構造＞

本発明の抗体薬物コンジュゲートにおいて薬物を抗体に結合させるリンカー構造について説明する。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリンカーは、抗体と薬物とを連結させるリンカーとして当業者が理解するものであれば特に限定されない。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリンカーとしては、例えば、Protein Cell、2018、9（1）：33-46、Pharm Res、2015、32：3526-3540、又はInt. J. Mol. Sci.、2016、17、561に記載さ

れるリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。リンカーは、生体内で切断されるリンカーであっても、生体内で切断されないリンカーであってもよいが、好ましくは、生体内で切断されるリンカーである。

[0054] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリンカーとしては、例えば、薬物を抗体のFc部分の糖鎖又はリモデリングされた糖鎖に結合させる（本明細書中、「糖鎖コンジュゲーション」という場合がある）リンカー（例えば、WO2018/003983に記載される）、又は薬物を抗体の任意のアミノ酸残基（例えば、システイン残基又はリシン残基）に結合させるリンカー（例えば、WO2014/057687に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。薬物を抗体の任意のアミノ酸残基に結合させるリンカーとしては、好ましくは、Abのシステインのスルフヒドリル基（SH基）とチオエーテル結合する場合（本明細書中、「システインコンジュゲーション」という場合がある）又はAbのリシンのアミノ基（NH₂基）とアミド結合する場合（本明細書中、「リシンコンジュゲーション」という場合がある）が挙げられ、好ましくは、システインコンジュゲーションである。

[0055] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される好ましいリンカーLは、次の式で表される。



（ここで、アスタリスクは、薬物Dと結合していることを示す）で示される。

[0056] まず、L_pについて説明する。L_pは、生体内又は標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカー（以下、本明細書中、ペプチドリッカーともいう）を示すか、又は存在しない。

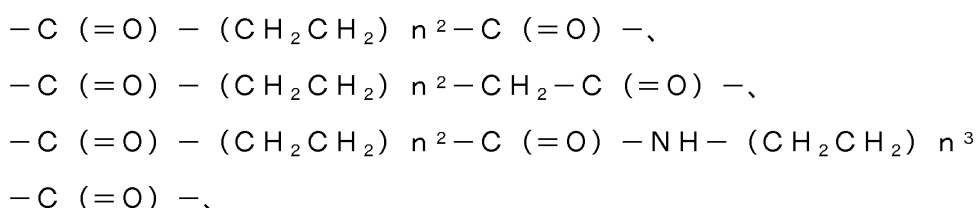
[0057] L_pは、例えば、ペプチダーゼやエステラーゼ等の酵素の作用によって、切断される。L_pは、2から7個（好ましくは、2から4個）のアミノ酸で構成されるペプチドである。L_pは、そのN末端において後述するL_aの右端のカルボニル基とアミド結合を形成し、C末端においてL_cのアミノ基（-NH-）とアミド結合を形成する。前記ペプチダーゼ等の酵素によって、

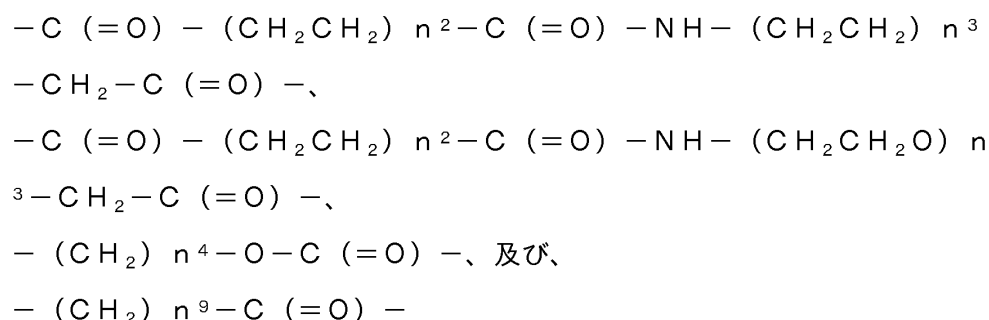
L p のC末端側のアミド結合が切断される。

[0058] L pを構成するアミノ酸は特に限定されることはないが、例えば、Lー又はDーアミノ酸であり、好ましくはLーアミノ酸である。また、 α -アミノ酸の他、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸等の構造のアミノ酸であってもよく、さらには、例えば、N-メチル化されたアミノ酸等の非天然型のアミノ酸であってもよい。L pのアミノ酸配列は、特に限定されないが、構成するアミノ酸として、グリシン (G l y ; G)、バリン (V a l ; V)、アラニン (A l a ; A)、フェニルアラニン (P h e ; F)、グルタミン酸 (G l u ; E)、イソロイシン (I l e ; I)、プロリン (P r o ; P)、シトルリン (C i t)、ロイシン (L e u ; L)、メチオニン (M e t ; M)、セリン (S e r ; S)、リシン (L y s ; K)、及びアスパラギン酸 (A s p ; D) 等を挙げることができる。これらのうちで好ましくは、グリシン (G l y ; G)、バリン (V a l ; V)、アラニン (A l a ; A)、フェニルアラニン (P h e ; F)、シトルリン (C i t)、イソロイシン (I l e ; I)、プロリン (P r o ; P) である。これらのアミノ酸は重複してもよく、任意に選択されたアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。また、アミノ酸の種類によって、薬物遊離のパターンをコントロールすることができる。

[0059] L pの具体例としては、例えば、-G G F G-、-G G P I-、-G G V A-、-G G F M-、-G G V C i t-、-G G F C i t-、-G G I C i t-、-G G P L-、-G G A Q-、-G G P P-を挙げることができる。リンカーL pは、好ましくは、-G G F G-又は-G G P I-であり、より好ましくは-G G F G-である。

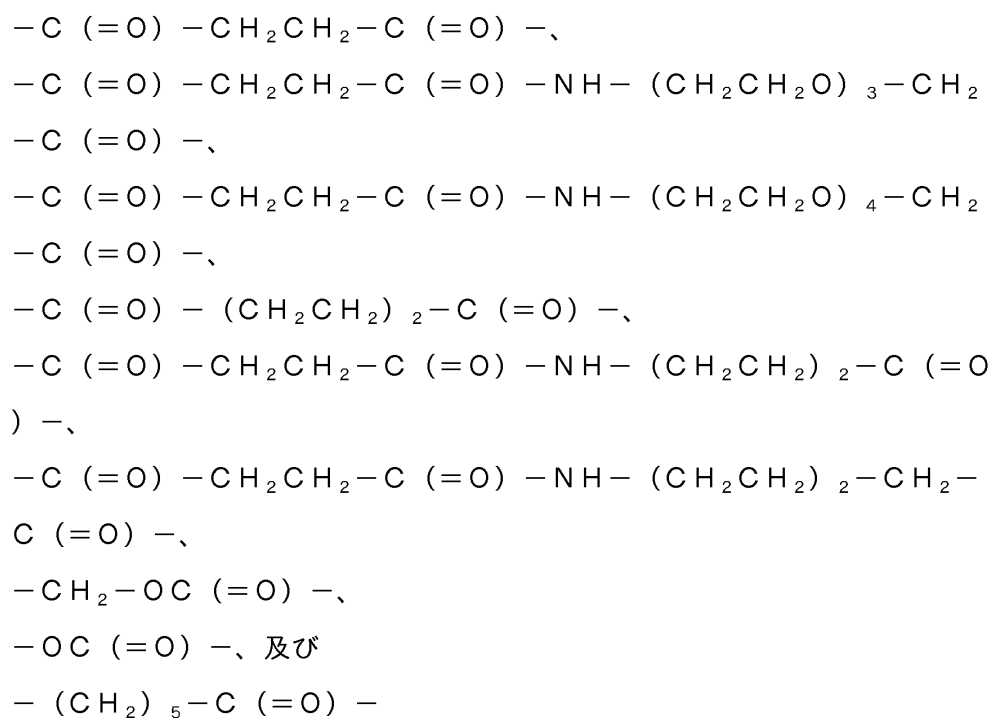
[0060] 次に、L aについて説明する。L aは、以下：





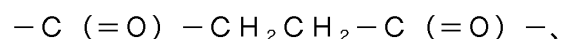
(ここで、式中、 n^2 は1～3の整数(好ましくは、1又は2)を示し、 n^3 は1～5の整数(好ましくは、2～5の整数、より好ましくは、3又は4)を示し、 n^4 は0～2の整数(好ましくは、0又は1)を示し、 n^9 は2～7の整数(好ましくは、2～5の整数、より好ましくは、2、3又は5)を示す)からなる群から選択されるいずれか一つを示す。

[0061] Laは、好ましくは、以下：



からなる群から選択されるいずれか一つを示す。

[0062] Laは、より好ましくは、



$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2$
 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2$
 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は
 $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$
 である。

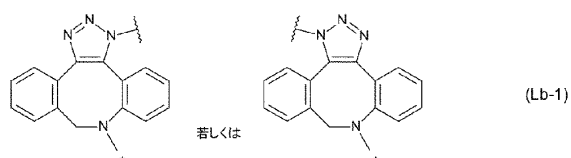
[0063] L a は、さらに好ましくは、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ である。

[0064] 次に、 L b について説明する。 L b は、糖鎖コンジュゲーションのリンカーに使用されるスペーサー（本明細書中、「糖鎖コンジュゲーションのリンカーのスペーサー」ともいう）、又はシステインコンジュゲーションのリンカーに使用されるスペーサー（本明細書中、「システインコンジュゲーションのリンカーのスペーサー」ともいう）を示す。

[0065] < L b が「糖鎖コンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合>

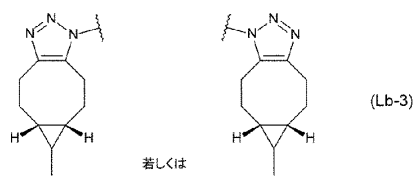
L b が「糖鎖コンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合、 L b は、特に限定されないが、例えば、次式で示されるスペーサーが挙げられる。

[0066] [化54]



又は

[0067] [化55]



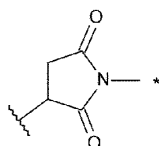
[0068] 上記で示されるそれぞれの構造式において、アスタリスク（*）はL aの左端の—（C＝O）—、—CH₂—又は—OC（＝O）—と結合していることを示し、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す。

[0069] L bにL b-1又はL b-3を選択する場合、トリアゾール環部位は、幾何異性構造を有し、1つのL b中に、2種類の構造のうちのいずれか一方を含むか、又はそれらの混合物を含む。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、抗体1分子に複数の薬物を結合させることができる。抗体1分子に複数の薬物を結合させる場合、L bも複数存在することになる（例えば、後述する〈3. 製造方法〉のE法に示した抗体薬物コンジュゲートの模式図（1e）を参照のこと）。L bがL b-1又はL b-3から選択され、そのL bが抗体1分子に対し複数存在する場合（例えば、後述するm²が1又は2の場合）、それぞれのL bにおいて、トリアゾール環部位は幾何異性構造を有し、1つのL b中に、2種類の構造のうちのいずれか一方を含むか、又はそれらの混合物を含む。

[0070] <L bが「システインコンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合>

L bが、「システインコンジュゲーションのリンカーのスペーサー」の場合、L bは、特に限定されないが、例えば、—（スクシンイミド-3-イル-N）—が挙げられる。本発明において、「—（スクシンイミド-3-イル-N）—」は、次式：

[0071] [化56]



で示される構造を有する。上記で示される構造式において、アスタリスクはL aと結合していることを示し、波線は抗体のシステイン残基の側鎖とチオエーテルを形成して結合していることを示す。

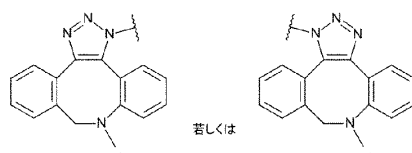
[0072] 次に、 L_c について説明する。 L_c は、 $-NH-CH_2-$ 、 $-NH-$ フェニル基 $-CH_2-O(C=O)-$ 又は $-NH-$ ヘテロアリアル基 $-CH_2-O(C=O)-$ を示すか、あるいは、存在しない。ここで、フェニル基としては、好ましくは、1, 4-フェニル基であり、ヘテロアリアル基として好ましくは、2, 5-ピリジル基、3, 6-ピリジル基、2, 5-ピリミジル基又は2, 5-チエニル基である。 L_c は、好ましくは、 $-NH-CH_2-$ であるか、又は存在しない。

[0073] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるより好ましいリンカー L は、薬物と抗体の結合様式が「糖鎖コンジュゲーション」である場合、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFCit-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGICit-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFM-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGLM-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-FG-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-CH_2-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-CH_2-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFCit-NH-CH_2-$ 、
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2-C(=O)-$ 、又は
 $-Z^{L1}-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_4-$

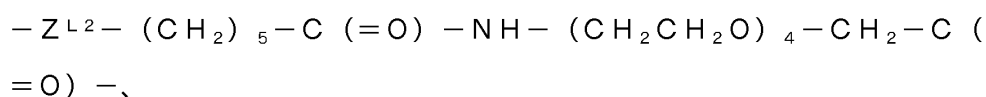
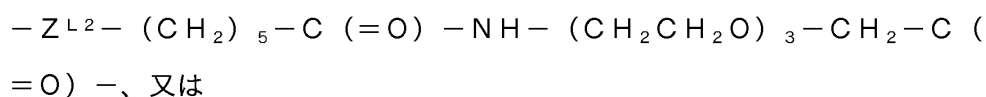
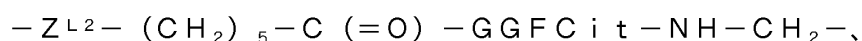
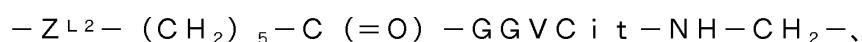
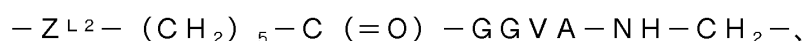
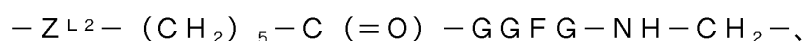
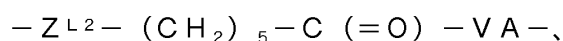
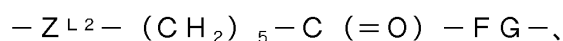
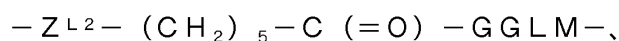
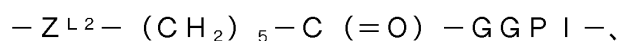
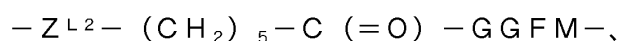
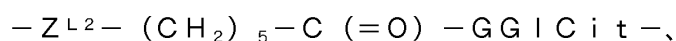
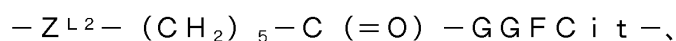
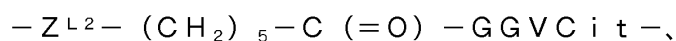
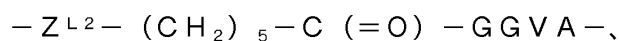
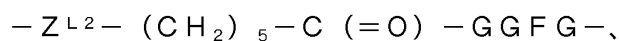


(ここで、 Z^{L1} は、上記L bの以下で示される構造式：

[0074] [化57]

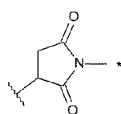


を示す)であり、あるいは薬物と抗体の結合様式が「システインコンジュゲーション」である場合、



(ここで、 Z^{L2} は、上記L bの以下で示される構造式：

[0075] [化58]



で示される－（スクシンイミド－3－イル－N）－を示す。）

である。

[0076] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるさらに好ましいリンカーL

は、薬物と抗体の結合様式が「糖鎖コンジュゲーション」であり、

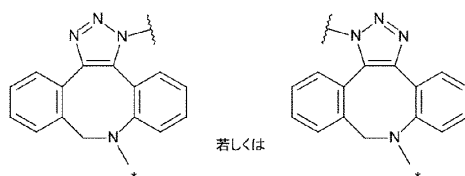
－Z^{L1}－C（＝O）－CH₂CH₂－C（＝O）－GGFG－NH－CH₂－、

又は

－Z^{L1}－C（＝O）－CH₂CH₂－C（＝O）－GGPI－NH－CH₂－、

（ここで、Z^{L1}は、上記L bの以下で示される構造式：

[0077] [化59]



を示す）である。

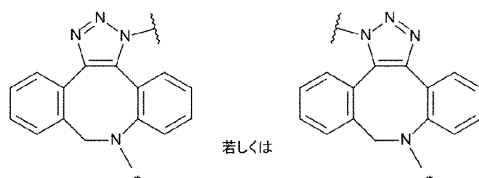
[0078] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるさらにより好ましいリンカ

ーLは、薬物と抗体の結合様式が「糖鎖コンジュゲーション」であり、

－Z^{L1}－C（＝O）－CH₂CH₂－C（＝O）－GGFG－NH－CH₂－、

（ここで、Z^{L1}は、上記L bの以下で示される構造式：

[0079] [化60]

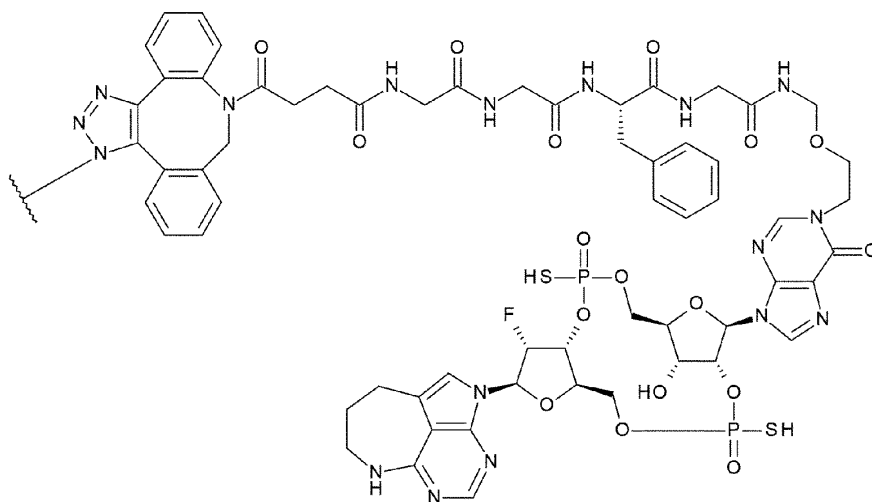


を示す）である。

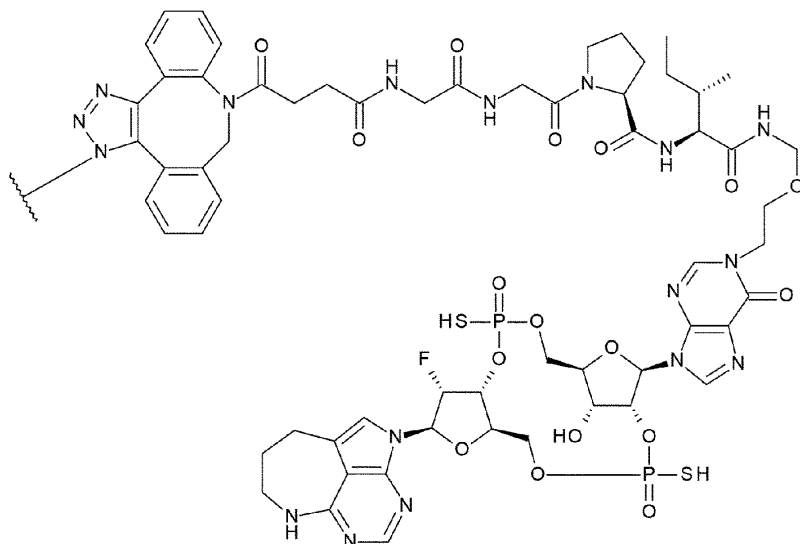
[0080] 上記の「好ましいリンカーL」、「より好ましいリンカーL」、「さらに好ましいリンカーL」及び「さらにより好ましいリンカーL」における右端は、薬物Dと結合している。

[0081] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される「リンカーLー薬物D」は、好ましくは、以下の2式：

[0082] [化61]



又は

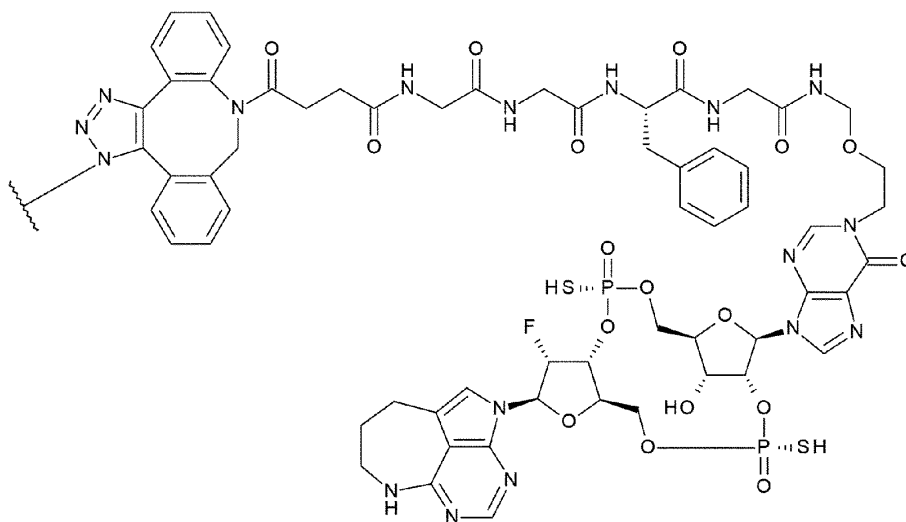


(ここで、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合しているこ

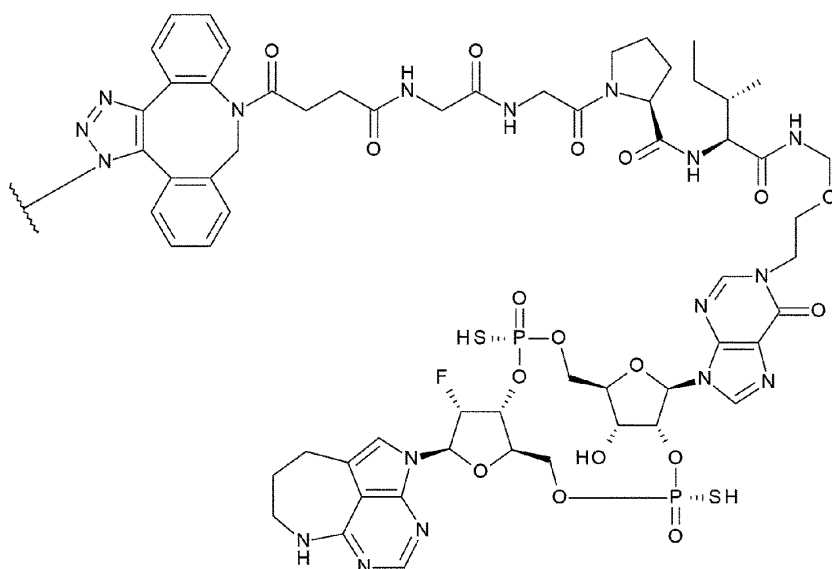
とを示す)で示される。

[0083] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される「リンカー-薬物D」は、より好ましくは、以下の2つの式：

[0084] [化62]



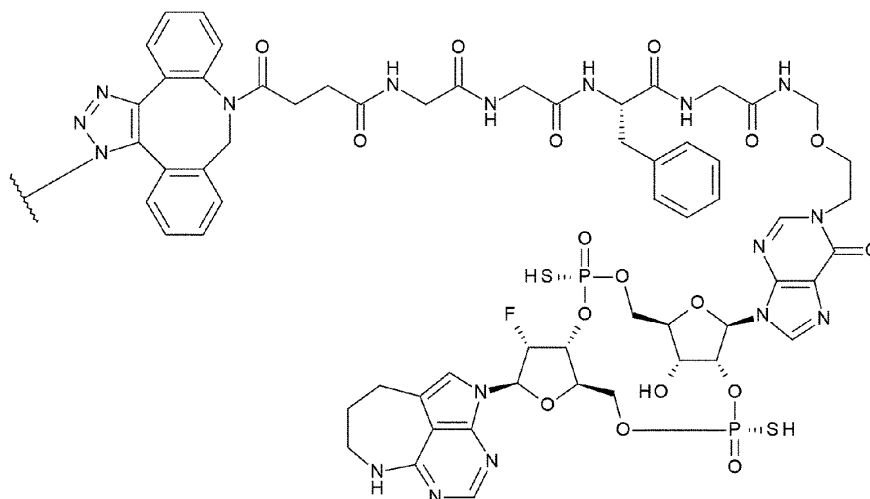
又は



(ここで、波線は、A bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)で示される。

[0085] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される「リンカー－薬物D」は、さらに好ましくは、以下の式：

[0086] [化63]



(ここで、波線はA bの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖と結合していることを示す)で示される。

[0087] <2. 2. 抗体及びその糖鎖修飾>

<2. 2. 1 抗体>

本明細書において、「遺伝子」とは、蛋白質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列が含まれるヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列、またはその相補鎖を意味し、例えば、蛋白質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列が含まれるヌクレオチド配列またはその相補鎖であるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、mRNA、cDNA、RNA等は「遺伝子」の意味に含まれる。

[0088] 本明細書において、「ヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド配列」と「核酸」は同義であり、例えば、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プライマー等も「ヌクレオチド」又は「ヌクレオチド配列」の意味に含まれる。

[0089] 本明細書においては、「ポリペプチド」、「ペプチド」、「蛋白質」は区

別せずに用いている。

- [0090] 本明細書において、「抗体の機能性断片」とは、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、 Fab 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、 $scFv$ 、 $diabody$ 、線状抗体及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、 $F(ab')_2$ を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片である Fab' も抗体の抗原結合断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。
- [0091] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体の機能性断片は、 IgG 重鎖の Fc 領域においてよく保存された N 結合型糖鎖による修飾を受けるアスパラギン($Asn297$)及びその周辺のアミノ酸を保持し、且つ抗原との結合能を有している機能性断片を含む。
- [0092] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体は、免疫グロブリンを意味し、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子である。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体として、 IgG 、 IgE 、 IgM 、 IgD 、 IgA 及び IgY のいずれのクラスでもよいが、 IgG が好ましい。また、サブクラスとして、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 、 $IgA1$ 及び $IgA2$ のいずれであってもよいが、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 又は $IgG4$ が好ましい(IgG 重鎖の Fc 領域に $ADCC$ 及び $ADCP$ 活性に影響する変異を持つ抗体を含む)。
- [0093] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体のアイソタイプとして $IgG1$ を用いる場合は、定常領域のアミノ酸残基の一部を置換することによって、エフェクター機能を調整することが可能である(WO88/07089、WO94/28027、WO94/29351参照)。 $IgG1$ の変異体としては、例えば、 $IgG1$ LALA変異($IgG1-L234A$ 、 $L235A$)が挙げられる。前記 $L234A$ 、 $L235A$ は、EU ind

ex (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 63, No. 1 (May 15, 1969), pp. 78-85) により特定される234位及び235位のロイシンのアラニンへの置換を示す。

- [0094] 抗体の定常領域には複数のアロタイプがあることが知られている。例えばIgG1重鎖についてはG1m17、G1m3、G1m1、G1m2が挙げられる。本発明で使用する抗体の定常領域としては、特に限定されないが、G1m17又はG1m3を用いるのが好ましい。
- [0095] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域 (CDR : Complementarity determining region) があることが知られている。CDRは、超可変領域 (hypervariable region) とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。
- [0096] 抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウス及びウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体には、ラット抗体、マウス抗体、ウサギ抗体等の非ヒト動物由来のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、それらの機能性断片、又はそれらの修飾体が含まれる。

- [0097] 抗体は、好ましくは、腫瘍細胞又は免疫細胞を標的にする抗体であるが、これらに限定されない。抗体は、より好ましくは、腫瘍細胞を標的にする抗体である。
- [0098] 腫瘍細胞を標的にする抗体が使用される場合、抗体としては、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性、さらには腫瘍細胞を傷害する特性の一又はそれ以上の特性を備えていることが好ましい。本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される薬物は、STINGアゴニスト活性を有する。該薬物は、インターフェロン制御因子3 (interferon regulatory factor-3 (IRF3)) のシグナルを活性化してインターフェロンを誘導する。従って、本発明の抗体薬物コンジュゲートに腫瘍細胞を標的にする抗体が使用される場合、抗体薬物コンジュゲートは体内に投与された後、腫瘍部位に送達され、腫瘍細胞内に取り込まれたあとペプチダーゼ等によってリンカー部分が切断されて薬物部分が遊離する。遊離した薬物部分はSTINGアゴニスト活性を通じて免疫細胞に対する腫瘍細胞の感受性を亢進するとともに抗腫瘍免疫を賦活化し、抗腫瘍効果を発揮させると考えられる。あるいは、腫瘍細胞に集積した抗体薬物コンジュゲートが内在化されなくても、腫瘍細胞及び／又は抗体薬物コンジュゲートが貪食作用によって免疫細胞に取り込まれ、STINGアゴニスト活性を通じて抗腫瘍免疫を賦活化し、抗腫瘍効果を発揮させることも考えられる。
- [0099] 抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認できる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みは、(1) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761)、(2) 治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ (Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004) 又は(3) 治療抗

体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab-ZAPアッセイ (Bio Techniques 28:162-165, January 2000) を用いて確認できる。イムノトキシンとしては、ジフテリア毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合蛋白質も使用可能である。

- [0100] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに腫瘍細胞を標的とした抗体を用いる場合、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。
- [0101] 薬物ならびに抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性は、腫瘍細胞への細胞傷害活性、抗細胞効果、腫瘍体積の退縮をいう。公知の*in vitro*又は*in vivo*の評価系を用いて、抗腫瘍活性を確認することができる。
- [0102] 薬物ならびに抗体薬物コンジュゲートの作用及び免疫賦活化活性は、免疫細胞に対する腫瘍細胞の感受性亢進又は腫瘍細胞を介した免疫細胞の賦活化をいう。公知の*in vitro*又は*in vivo*の評価系を用いて、薬物ならびに抗体薬物コンジュゲートの作用及び免疫賦活化活性を確認することができる。
- [0103] 本発明で利用できる*in vitro*又は*in vivo*の評価系としては、試験例4記載の、CT26、WT及びCT26、WT-hCD70細胞株とマウス骨髄由来樹状細胞との共培養アッセイ系、試験例5記載の、マウス大腸がん細胞株CT26、WTにヒトTROP2遺伝子を導入したCT26、WT-hTROP2細胞が皮下移植されたBALB/cマウスの系、試験例6記載の、マウス大腸がん細胞株CT26、WTにヒトEGFR遺伝子を導入したCT26、WT-hEGFR細胞が皮下移植されたBALB/cマウスの系、試験例7記載の、ヒト腎がん細胞株Caki-1細胞を皮下移植したBALB/c-nuマウスの系、試験例8記載の、ヒト腎がん細胞株A-498 (HTB-44)細胞が皮下移植されたBALB/c-nuマウスの系、試験例9記載の、抗体薬物コンジュゲートに含まれる抗体が結合する抗原上のエピトープ部位がヒト型に置換されたヒトマウスキメラ抗原の遺伝子を導入したマウス大腸がん細胞株CT26、WT (CRL2638)が

皮下移植されたBALB/cマウスの系等を例示することができるが、それらに限定されるものではない。

- [0104] 本発明に使用される抗体としては、抗CD70抗体、抗TROP2抗体、又は抗EGFR抗体が挙げられる。
- [0105] 本発明に使用される抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。
- [0106] また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497、Kennett, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。
- [0107] なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。
- [0108] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される抗体は公知の方法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984)、Nature (1986) 321, p. 522-525、WO90/07861）に従って取得することができる。
- [0109] 例えば、抗CD70抗体（WO2004/073656、WO2007/038637等）、抗TROP2抗体（WO2015/098099等）、抗EGFR抗体（WO1998/050433、WO2002/092771等）は、公知の手段によって取得することができる。
- [0110] 本発明に使用される抗CD70抗体は、特に制限はないが、例えば、以下

の特性を有するものが望ましい。

(1) CD70に特異的に結合する抗CD70抗体。

(2) ヒトCD70の細胞外ドメインに結合する上記(1)に記載の抗体。

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

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

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

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

(7) 重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUインデックスにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記(5)に記載の抗体。

(8) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(9) 配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(10) 配列番号35に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号36に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号37に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号38に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号39に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号40に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなる抗体ヒト化モノクローナル抗体である上記(7)

）に記載の抗体。

（１１）配列番号４１に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号４２に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号４３に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号４４に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号４５に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記（７）に記載の抗体。

（１２）重鎖カルボキシル末端において１又は２つのアミノ酸が欠失している上記（１）～（１１）のいずれかに記載の抗体。

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

[0111] 抗CD70抗体としては、例えば、vorsezumab、MDX-1115、Cusatuzumabを挙げることができ、好適にはvorsezumab、MDX-1115を挙げることができる。

[0112] 本発明に使用される抗TROP2抗体は、特に制限はないが、例えば、以下の特性を有するものが望ましい。

（１）TROP2に特異的に結合する抗TROP2抗体。

（２）ヒトTROP2の細胞外ドメインに結合する上記（１）に記載の抗体。

（３）前記抗体がモノクローナル抗体である上記（１）又は（２）に記載の抗体。

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

（５）マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体又はヒト化モノクローナル抗体である、上記（１）～（４）の

いずれかに記載の抗体。

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

(7) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗体。

(8) 重鎖定常領域がヒト IgG1 の重鎖定常領域であり、EU インデックスにより示される 234 位及び 235 位のロイシンがアラニンに置換されている、上記 (5) に記載の抗体。

(9) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 7 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記 (8) に記載の抗体。

(10) 配列番号 47 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L1、配列番号 48 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L2、及び配列番号 49 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 50 に記載のアミノ酸配列からなる CDR H1、配列番号 51 に記載のアミノ酸配列からなる CDR H2、及び配列番号 52 に記載のアミノ酸配列からなる CDR H3 を含む重鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記 (8) に記載の抗体。

(11) 配列番号 53 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L1、配列番号 54 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L2、及び配列番号 55 に記載のアミノ酸配列からなる CDR L3 を含む軽鎖、並びに、配列番号 56 に記載のアミノ酸配列からなる CDR H1、配列番号 57 に記載のアミノ酸配列からなる CDR H2、及び配列番号 58 に記載のアミノ酸配列からなる CDR H3 を含む重鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記 (8) に記載の抗体。

(12) 重鎖カルボキシル末端において 1 又は 2 つのアミノ酸が欠失してい

る上記（１）～（１１）のいずれかに記載の抗体。

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

[0113] 本発明に使用される抗EGFR抗体は、特に制限はないが、例えば、以下の特性を有するものが望ましい。

（１）EGFRに特異的に結合する抗EGFR抗体。

（２）ヒトEGFRの細胞外ドメインに結合する上記（１）に記載の抗体。

（３）前記抗体がモノクローナル抗体である上記（１）又は（２）に記載の抗体。

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

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

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

（７）重鎖定常領域がヒトIgG1の重鎖定常領域であり、EUインデックスにより示される234位及び235位のロイシンがアラニンに置換されている、上記（５）に記載の抗体。

（８）配列番号10に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号9に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記（７）に記載の抗体。

（９）配列番号12に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号11に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記（７）に記載の抗体。

(10) 配列番号59に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号60に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号61に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号62に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号63に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号64に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(11) 配列番号65に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号66に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号67に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を含む軽鎖、並びに、配列番号68に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号69に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号70に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3を含む重鎖を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である上記(7)に記載の抗体。

(12) 重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失している上記(1)～(11)のいずれかに記載の抗体。

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

[0114] 抗EGFR抗体としては、例えば、panitumumab、nimotuzumab、cetuximab、ametumumab (SY-101)、SYN-004、SCT-200、tomuzotuximab、GC-1118、GR-1401、depatuxizumab (ABT-806)を挙げることができ、好適にはpanitumumab、ABT806を挙げることができる。

[0115] 本発明に使用される抗体は、上記の抗体の重鎖及び／又は軽鎖と比較して80%乃至99%のアミノ酸同一性を有する抗体であってもよい。ここで「

同一性」なる用語は、当分野で使用される一般的な定義を有するものとする。同一性の％は、2つのアミノ酸配列をアミノ酸の一致度が最大となるように整列（アラインメント）させたときの総アミノ酸数（ギャップを含む。）あたりの同一アミノ酸数のパーセンテージを指す。このような同一性は、一般的には80％以上の同一性であり、好ましくは90、91、92、93又は94％以上の同一性であり、より好ましくは95、96、97又は98％以上の同一性であり、さらに好ましくは99％以上の同一性である。また、重鎖及び／又は軽鎖のアミノ酸配列に1乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の各種作用を有する抗体を選択することが可能である。置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基数は、一般的には10アミノ酸残基以下であり、好ましくは5乃至6アミノ酸残基以下であり、より好ましくは2乃至3アミノ酸残基以下であり、さらに好ましくは1アミノ酸残基である。

[0116] <2. 2. 2 抗体の糖鎖リモデリング>

近年、不均一な抗体の糖鎖を、酵素反応によってリモデリングし、官能基を有する糖鎖を均一に導入する方法が報告されている（ACS Chem. Biol. 2012, 7, 110-122, ACS Med. Chem. Lett. 2016, 7, 1005-1008）。この糖鎖リモデリング技術を用いて、部位特異的に薬物を導入し、均一なADCを合成する試みもなされている（Bioconjugate Chem. 2015, 26, 2233-2242, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367, US2016361436）。

[0117] 糖鎖のリモデリングは、まず加水分解酵素を利用して、蛋白質（抗体等）に付加されている不均一な糖鎖を末端のGlcNAcのみ残して切除し、GlcNAcが付加した均一な蛋白質部分を調製する（以下、「アクセプター」という）。次に、別途調製した任意の糖鎖を用意し（以下、「ドナー」と言う）、このアクセプターとドナーとを、糖転移酵素を用いて連結する。こ

れにより、任意の糖鎖構造を持った均一な糖蛋白質を合成できる。

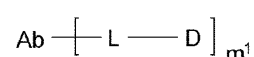
[0118] 本発明において、「糖鎖」とは、2つ以上の単糖がグリコシド結合により結合された構造単位を意味する。具体的な単糖や糖鎖を、例えば“GlcNAc”、“SG”のように、略号として標記することがある。構造式中でこれらの略号で記載した場合、還元末端で別の構造単位とのグリコシド結合に帰属する酸素原子又は窒素原子は、特別な定義がある場合を除き、当該糖鎖を表す略号には含まれないものとして表示される。

[0119] 本発明において、糖鎖の基本単位となる単糖の記載は、別に定める場合を除き、便宜上、その環構造において、環を構成する酸素原子に結合し、且つ、ヒドロキシ基（又はグリコシド結合に帰属する酸素原子）と直接結合した炭素原子を1位（シアル酸においてのみ2位）として表記する。実施例化合物の名称は、化学構造全体として付されたものであり、このルールは必ずしも適用されない。

[0120] 本発明において、糖鎖を記号（例えば、SG、MSG、GlcNAc等）として記載する場合、別に定義される場合を除き、還元末端の炭素までを、当該記号に含めるものとし、N-又はO-グリコシド結合に帰属するN又はOは、当該記号には含まれないものとする。

[0121] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、次式：

[0122] [化64]

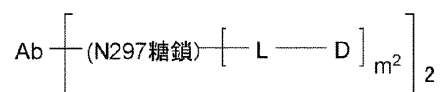


で示され、抗体Ab又はその機能性断片は、そのアミノ酸残基（例えば、システイン、リシン等）の側鎖から直接Lに結合するか、Abの糖鎖又はリモデリングされた糖鎖からLに結合している。

[0123] 本発明におけるAbの糖鎖は、N結合型糖鎖やO結合型糖鎖であり、好ましくは、N結合型糖鎖である。

[0124] N結合型糖鎖はNグリコシド結合、O結合型糖鎖はOグリコシド結合により、抗体のアミノ酸側鎖と結合している。

- [0125] 本発明におけるAbは、IgGであり、好ましくは、IgG1、IgG2又はIgG4である。
- [0126] IgGはその重鎖のFc領域における297番目のアスパラギン残基（以下、「Asn297又はN297」という）によく保存されたN結合型糖鎖（以下、「Asn297糖鎖又はN297糖鎖」という）を有しており、抗体分子の活性や動態等に寄与することが知られている（Eon-Duval, A. et al, Biotechnol. Prog. 2012, 28, 608-622、Sanglier-Cianferani, S., Anal. Chem. 2013, 85, 715-736）。
- [0127] IgGの定常領域におけるアミノ酸配列はよく保存されており、Edelmanらの報告（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 63, 78-85, (1969)）において、それぞれのアミノ酸がEU番号（EU INDEX）で特定されている。例えば、Fc領域においてN結合型糖鎖が付加するAsn297は、EU番号において297位に相当するものであり、分子の断片化や領域欠損によって実際のアミノ酸位置が変動した場合であってもEU番号で表示することによってアミノ酸が一義的に特定される。
- [0128] 下図は本発明の抗体薬物コンジュゲートが抗体又はその機能性断片の前記N297糖鎖からLに結合している場合を示す。
- [0129] [化65]



なお、当該リモデリングされた糖鎖を有する抗体を糖鎖リモデリング抗体という。

- [0130] SGP ($\alpha 2, 6$ -SGP) は、Sialylglycopeptideの略であり、N結合型糖ペプチドの代表的なものである。SGPは、例えば、WO2011/027868に記載の方法に従って、鶏卵の卵黄より単離、精製することができる。また、SGPの精製品が東京化成工業及び伏見製

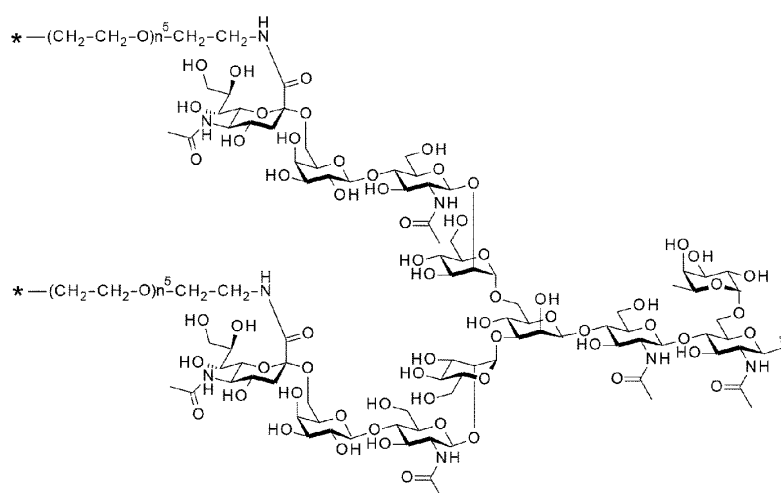
薬所から販売されている。本明細書において、SGPの糖鎖部分をSGと表記し、SGの還元末端のGlcNAcが一つ欠損した糖鎖をSG(10)と表記する。SG(10)は、例えば、梅川らの報告(Biochim. Biophys. Acta 2010, 1800, 1203-1209)を参照して、SGPの酵素的な加水分解により調製することができる。また、SG(10)も東京化成工業及び伏見製薬所から購入することができる。

[0131] 本明細書において、SG(10)の β -Manの分岐鎖のいずれか一方のみで非還元末端のシアル酸が欠失した糖鎖構造をMSG(9)と表記し、分岐鎖の1-3糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG1、分岐鎖の1-6糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG2、とそれぞれ表記する。

[0132] 本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用されるリモデリングされた糖鎖は、N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、又はN297-(Fuc)MSG1とN297-(Fuc)MSG2の混合物であり、好ましくは、N297-(Fuc)SG、N297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2であり、より好ましくはN297-(Fuc)SG又はN297-(Fuc)MSG1である。

[0133] N297-(Fuc)SGは以下の構造式又は配列式で示される。

[0134] [化66]



[0140] 上記式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

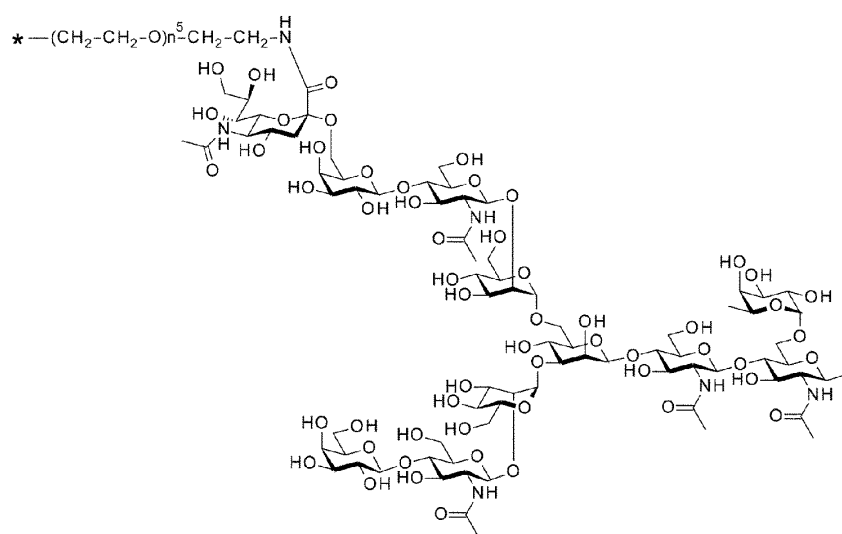
L (P E G) は、 $-(CH_2-CH_2-O)^{n^5}-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該 L (P E G) の右端のアミノ基が N 2 9 7 糖鎖の β -M a n の分岐鎖の 1-3 鎖側の非還元末端のシアル酸の 2 位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

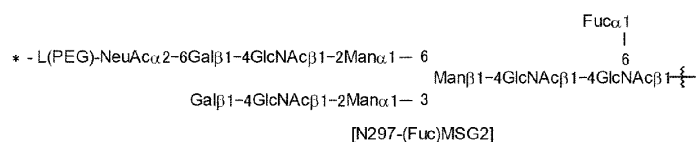
ここで、 n^5 は、2~10 の整数であり、好ましくは、2~5 の整数である。

[0141] N 2 9 7 - (F u c) M S G 2 は以下の構造式又は配列式で示される。

[0142] [化70]



[0143] [化71]



[0144] 上記式中、波線は抗体の A s n 2 9 7 に結合していることを示し、

L (PEG) は、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-NH-$ を示し、該L (PEG) の右端のアミノ基がN297糖鎖の β -Manの分岐鎖の1-6鎖側の非還元末端のシアル酸の2位のカルボキシル基とアミド結合していることを示し、

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

ここで、 n^5 は2~10の整数であり、好ましくは、2~5の整数である。

[0145] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖が、N297-(Fuc)SGである場合、抗体は二量体であるため、抗体薬物コンジュゲートは4つのリンカーL及び4つの薬物Dが結合された分子(上記 $m^2=2$)となる。

[0146] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖が、N297-(Fuc)MSG1もしくはN297-(Fuc)MSG2又はそれらの混合物である場合、抗体は二量体であるため、抗体薬物コンジュゲートは2つのリンカーL及び2つの薬物Dが結合された分子(上記 $m^2=1$)となる(図1参照)。

[0147] N297糖鎖は、好ましくは、N297-(Fuc)SGもしくはN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2であり、より好ましくは、N297-(Fuc)SG又はN297-(Fuc)MSG1であり、さらに好ましくはN297-(Fuc)SGである。

[0148] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおける抗体のN297糖鎖がN297-(Fuc)SGもしくはN297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2である場合、均一性の高いADCを取得することができる。

[0149] <3. 製造方法>

本発明の新規CDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体の代表的な製造方法を説明する。なお、以下において、化合物を示すた

めに、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、「式(1)の化合物」、「化合物(1)」等と称する。また、これ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0150] 下記のA法～E法において、置換基 L^1 は、前記と同義である。置換基 L^2 は、下記(i)又は(ii)：

(i) L と結合するとき、 L^2 は、 $-NHR'$ 、ヒドロキシ $C1-C6$ アルキル基又はアミノ $C1-C6$ アルキル基を示し、ここで、 R' は、水素原子、 $C1-C6$ アルキル基、 $C2-C6$ アルケニル基、 $C2-C6$ アルキニル基又は $C3-C6$ シクロアルキル基を示し、該 $C1-C6$ アルキル基、 $C2-C6$ アルケニル基又は $C2-C6$ アルキニル基は、1から6個のハロゲン原子で置換されてもよい；又は

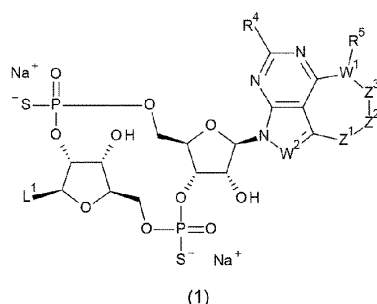
(ii) L と結合しないとき、 L^2 は、水素原子又はハロゲン原子を示す、
から選択される基を示す。置換基 W^1 は、 $-NH-$ 又は硫黄原子を示す。置換基 W^2 は、 $-CH=$ を示す。置換基 $Z^1 \sim Z^3$ は、一緒になって、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ を示す。置換基 $R^1 \sim R^3$ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、 $-OR'$ 、 $-OC(=O)R'$ 、 $-N_3$ 、 $-NHR'$ 、 $-NR'R''$ 又は $-NHC(=O)R'$ （ここで、 R' は、前に定義した通りであり、 R'' は、 $C1-C6$ アルキル基、 $C2-C6$ アルケニル基、 $C2-C6$ アルキニル基又は $C3-C6$ シクロアルキル基を示す）を示す。置換基 R^4 は、水素原子を示す。置換基 R^5 は、 W^1 が窒素原子のとき、 R^5 は水素原子を示し、 W^1 が酸素原子のとき、 R^5 は存在しない。置換基 R^a 、 R^c 、 R^e 及び R^g は、天然型 α -アミノ酸の側鎖を示す。例えば、メチル基、イソプロピル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、ベンジル基等である。 PRO^1 は、第一級アルコールの保護基を示す。好適には、4,4'-ジメトキシトリチル基、4-メトキシトリチル基等である。 PRO^2 、 PRO^3 、 PRO^7 、 PRO^8 は、第二級アルコールの保護基を示す。好適には*tert*-ブチルジメチルシリル基、トリイソプロピルシリルオキシメチル基、ベンゾイル基、2-ニ

トロベンジル基、4-メトキシテトラヒドロピラン-4-イル基等である。
 PRO^6 はカルボン酸の保護基を示す。好適には、*tert*-ブチル基、ベンジル基等である。 PRO^5 、 PRO^9 は、アミンの保護基を示す。 PRO^5 は、好適には、*tert*-ブチルオキシカルボニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等であり、 PRO^9 は、好適には、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基又は2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル基である。 PRO^4 は、アルコール又はアミンの保護基を示す。アルコールの場合、好適には*tert*-ブチルジメチルシリル基、ベンゾイル基等であり、アミンの場合、好適には2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル基、アリルオキシカルボニル基、*tert*-ブチルオキシカルボニル基等である。 Q^a は酸素原子又は硫黄原子を示し、 Q^b はヒドロキシ基又はチオール基を示す。 $Q^{a'}$ 及び $Q^{b'}$ は、それぞれ独立して、負に荷電した酸素原子(O^-)又は硫黄原子(S^-)を示す。 R^x 及び R^y は、それぞれ独立して、ハロゲン原子又は $-O-PRO^2$ を示す。 n は1から3の整数を示す。

[0151] A法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される(1)で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA法に従って製造することができる。

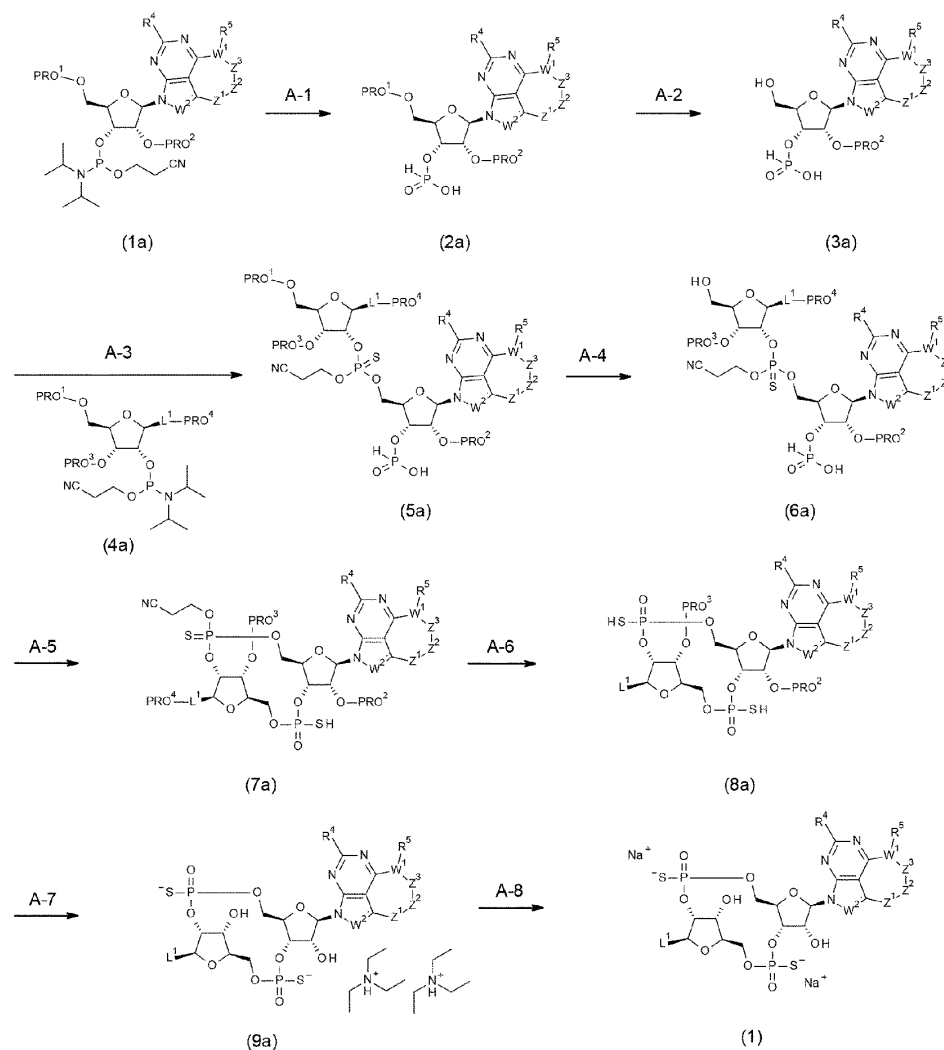
[0152] [化72]



[0153] 本製造法は一般式(1)で表される化合物を製造するための方法である。本製造法のA-1工程からA-5工程まではワンポット合成が可能であるが、

これは、Gaffneyらの報告 (Org. Lett. 2010, 12, 3269-3271) を参照して実施することができる。

[0154] [化73]



[0155] (A-1工程)

本工程は、式(1a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて加水分解反応とシアノエチル基の除去を連続して行うことにより、式(2a)の化合物を製造する工程である。化合物(1a)を溶媒(アセトニトリル、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド又はそれらの混合溶媒)中で、 -10°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 15°C から

35℃までに於いて、水及び酸（ピリジントリフルオロ酢酸塩、4,5-ジシアノイミダゾール、1H-テトラゾール等）で処理することにより加水分解反応を実施した。化合物（1a）1モルに対して、水は2モルから過剰モル、好ましくは2モルから10モル用い、酸は1モルから過剰モル、好ましくは1モルから5モル用いた。反応時間は1分間から3時間、好ましくは5分間から30分間である。次いで、この反応液に塩基（tert-ブチルアミン等）を添加してシアノエチル基を除去した。塩基は、化合物（1a）1モルに対して過剰モル、好ましくは30モルから50モル用いた。反応時間は、5分間から6時間、好ましくは15分間から1時間である。反応液を減圧下で濃縮して、化合物（2a）の粗体を得た。化合物（2a）の粗体は、精製せずに次の工程へと進めることができる。

[0156] (A-2工程)

本工程は、式（2a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式（3a）の化合物を製造する工程である。本工程の反応を開始する前に、必要に応じて、アセトニトリルを用いて1回から3回共沸し、式（2a）の粗体を乾燥させた。PRO¹が4,4'-ジメトキシトリチル基の場合、化合物（2a）を溶媒（ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等）中で、-10℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは15℃から35℃までに於いて、水と酸（ジクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等）で処理することにより4,4'-ジメトキシトリチル基を除去した。化合物（2a）1モルに対して、水は過剰モル、好ましくは10モルから20モル用い、酸は、反応に用いる溶媒で1%から50%（v/v）、好ましくは5%から10%（v/v）まで希釈し、その希釈溶液を過剰モル、好ましくは5モルから15モル用いた。反応時間は1分間から3時間、好ましくは5分間から30分間である。反応液にピリジンを加えて反応停止処理をした。ピリジンは用いた酸を十分中和できる量、好ましくは酸1モルに対して2モルから10モル用いた。反応液を減圧下で濃縮して、化合物（3a）の粗体を得た。化合物（3a）の粗体を、脱水アセトニトリルを

用いて3回から5回共沸した。最後の共沸時にアセトニトリルを残し、化合物(3a)の0.01Mから1Mのアセトニトリル溶液を得た。得られたアセトニトリル溶液を、そのまま次の工程へと進めた。

[0157] (A-3工程)

本工程は、式(3a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(4a)の化合物とのカップリング反応及び得られたカップリング体の硫化反応を連続して行うことにより、式(5a)の化合物を製造する工程である。本工程の反応を開始する前に、化合物(4a)を、脱水アセトニトリルを用いて3回から5回共沸した。最後の共沸時にアセトニトリルを残し、化合物(4a)の0.01Mから1Mのアセトニトリル溶液を調製した。この溶液に乾燥剤(粉末状又はペレット状のモレキュラーシーブス3Aもしくはモレキュラーシーブス4A)を添加し、溶液を使用するまで窒素又はアルゴン雰囲気下で保存した。化合物(3a)のアセトニトリル溶液に、5℃から35℃までに於いて、共沸により乾燥させた化合物(4a)のアセトニトリル溶液を添加することによりカップリング反応を実施した。反応時間は、1分から24時間、好ましくは5分から6時間である。次いで、この反応液に硫化剤(N,N-ジメチル-N'-(3-スルファニリデン-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-イル)メタンイミドアミド、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン等)を添加して硫化反応を実施した。硫化剤は化合物(3a)1モルに対して1モルから5モル、好ましくは1モルから2モル用いた。反応時間は5分から24時間、好ましくは30分から6時間である。反応液を減圧下で濃縮して、化合物(5a)の粗体を得た。得られた化合物(5a)の粗体は、そのまま次の工程へと進めた。

[0158] (A-4工程)

本工程は、式(5a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式(6a)の化合物を製造する工程である。PRO¹が4,4'-ジメトキシトリチル基の場合、化合物(5a)の化合物を溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等)中で、-10

℃から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは15℃から35℃までに於いて、水と酸（ジクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等）で処理することにより、4, 4'-ジメトキシトリチル基を除去した。化合物（5 a）1モルに対して、水は過剰モル、好ましくは10から20モルを用い、酸は、反応に用いる溶媒で1%から50%（v/v）、好ましくは5%から10%（v/v）まで希釈し、その希釈溶液を過剰モル、好ましくは5モルから15モル用いた。反応時間は1分から3時間、好ましくは5分から30分間である。反応液にピリジンを加えて反応停止処理をした。ピリジンは用いた酸を十分中和できる量、好ましくは酸1モルに対して10モルから200モル用いた。反応液を減圧下で濃縮して、化合物（6 a）の粗体を得た。得られた化合物（6 a）の粗体を、そのまま次の工程へと進めた。

[0159] （A-5工程）

本工程は、式（6 a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて環化反応と硫化反応を連続して行い、式（7 a）の化合物を製造する工程である。化合物（6 a）をピリジンに溶解後、減圧下で濃縮して0.01Mから0.5Mのピリジン溶液を調製した。このピリジン溶液に、5℃から35℃までに於いて、脱水縮合剤（2-クロロ-5, 5-ジメチル-1, 3, 2λ⁵-ジオキサホスフィナン-2-オン等）を添加することにより環化反応を実施した。脱水縮合剤は、化合物（6 a）1モルに対して、1モルから過剰モル、好ましくは3モルから5モル用いた。反応時間は1分から6時間、好ましくは5分から1時間である。次いで、この反応液に水と硫化剤（3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン、N, N-ジメチル-N'-（3-スルファニリデン-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-5-イル）メタンイミドアミド等）とを添加して硫化反応を実施した。化合物（6 a）1モルに対して、水は過剰モル、好ましくは30モルから50モル用い、硫化剤は1モルから5モル、好ましくは1モルから2モル用いた。反応時間は5分から12時間、好ましくは30分から3時間である。反応液を炭酸水素ナトリウム水溶液（0.1Mから1Mまで）に加えた後、15分から24時間

攪拌して反応停止処理をした。反応液を有機溶媒（酢酸エチル、ジエチルエーテル、トルエン又はそれらの混合溶媒）で1回から5回抽出した後、抽出液を併せて無水塩（無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム）で乾燥した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール、酢酸エチル／メタノール、ヘキサン／酢酸エチル等〕、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（7a）を2種類以上のジアステレオマー混合物又は2種類以上の純粋なジアステレオマーとして得た。本工程では多くの場合、2種類のジアステレオマーが得られるが、原料（1a）及び（4a）に依存して、更に1種類又は2種類のジアステレオマーが得られることもある。得られた化合物（7a）が複数のジアステレオマー混合物であっても、それ以上の精製をせずに次の工程へと進めることができる。

[0160] （A-6工程）

本工程は、式（7a）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてシアノエチル基及び全てのアシル系保護基を同時に除去し、式（8a）の化合物を製造する工程である。本工程は、必要に応じてオートクレーブ中、又はシールドチューブ中で実施した。PRO⁴がベンゾイル基の場合、化合物（7a）の化合物を溶媒（メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン又はそれらの混合溶媒）中で、5℃から反応に用いる溶媒の沸点までに於いて、28%（v/v）アンモニア水で処理することによりシアノエチル基とベンゾイル基を除去した。アンモニアは、化合物（7a）1モルに対して過剰モル、好ましくは300モルから3000モル用いた。反応時間は30分間から96時間、好ましくは2時間から48時間である。必要に応じて反応液を濃縮し、残留物を分取HPLC〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル、緩衝液／メタノール等〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（8a）を得た。得られた化合物（8a）がジアステレオマー混合

物であっても、それ以上の精製をせずに次の工程へと進めることができる。

また、本工程では精製をせずにそのまま次の工程へと進めることもできる。

[0161] (A-7工程)

本工程は、式(8a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて全てのシリル系保護基を同時に除去し、式(9a)の化合物を製造する工程である。PRO²及びPRO³がtert-ブチルジメチルシリル基の場合、化合物(8a)を、5℃から100℃まで、好ましくは35℃から60℃までに於いて、直接トリエチルアミン三フッ化水素酸塩で処理することによりtert-ブチルジメチルシリル基を除去した。トリエチルアミン三フッ化水素酸塩は、化合物(8a)1モルに対して過剰モル、好ましくは100から200モル用いた。反応時間は30分間から24時間、好ましくは2時間から12時間である。反応液を室温まで冷却後、反応液に氷冷した1M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液とトリエチルアミンの3:1から10:1(v/v)の混合溶液を少しずつ注いで反応停止処理をした。必要に応じて、反応液を氷冷した1M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液とトリエチルアミンの混合溶液に注いでもよい。この場合は、反応容器をアセトニトリルと水で洗浄した。トリエチルアミンは反応液の液性を弱塩基性へと変化させられる十分量、好ましくはトリエチルアミン三フッ化水素酸塩1モルに対して、トリエチルアミンを約2モル用いる。反応液の有機溶媒成分を減圧下で留去した後、残留した水溶液を分取HPLC[緩衝液/アセトニトリル、緩衝液/メタノール等]、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[緩衝液/アセトニトリル、緩衝液/メタノール等]又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物(9a)を単一のジアステレオマーとして得た。

[0162] (A-8工程)

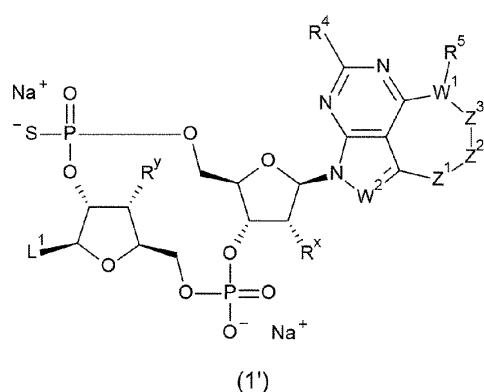
本工程は、式(9a)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてイオン交換し、式(1)の化合物を製造する工程である。陽イオン交換樹脂(BT AG(登録商標) 50W-X2レジン, 100-200メッシュ, 水素型)を純水に懸濁させ、空のカラムカートリッジに充填した。陽イオン

交換樹脂は、重量比で化合物（9 a）の10倍から50倍量用いた。過剰の純水を自然流下させた後、1 M水酸化ナトリウム水溶液を3カラム体積自然流下させ、次いで、6カラム体積の純水を自然流下させた。化合物（9 a）を約3カラム体積の純水に溶解して、カラムにチャージした。化合物が純水に溶解しにくい場合は、少量の有機溶媒（アセトニトリル、メタノール等）との混合液を用いてもよい。自然流下した溶液を分取後、更に6カラム体積の純水等で溶出し、画分を分取した。目的物を含む画分を併せて凍結乾燥し、化合物（1）を単一のジアステレオマーとして得た。

[0163] A' 法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（1'）で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA'法に従って製造することができる。

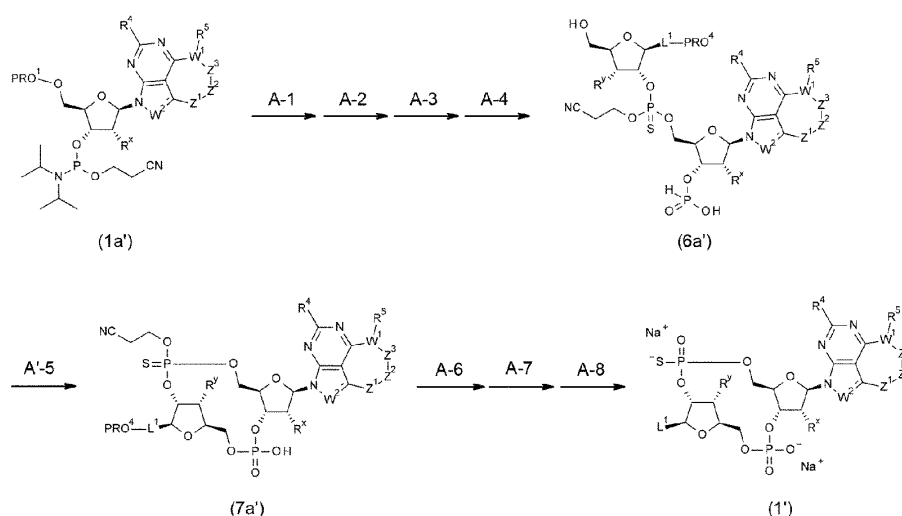
[0164] [化74]



[0165] 本製造法は、A法の一部を変更して一般式（1'）で表される化合物を製造するための方法である。具体的には、一般式（1'）の化合物はA法A-5工程を以下に示すA'-5工程に変更して製造することができる。また、置換基R^xとR^yが両方ハロゲン原子の場合は、A-7工程を省略することができる。

[0166]

[化75]



[0167] (A' - 5 工程)

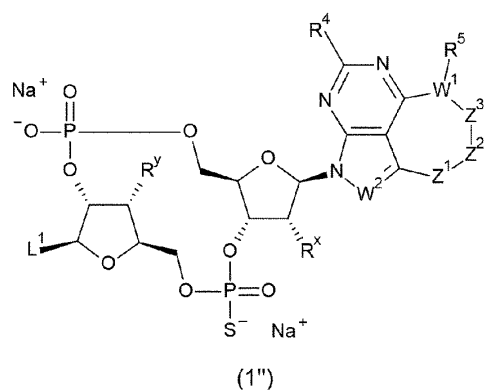
本工程は、式(6a')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて環化反応と酸化反応を連続して行い、式(7a')の化合物を製造する工程である。化合物(6a')をピリジンに溶解後、減圧下で濃縮して0.01Mから0.5Mのピリジン溶液を調製した。このピリジン溶液に、5℃から35℃までに於いて、脱水縮合剤(2-クロロ-5,5-ジメチル-1,3,2λ⁵-ジオキサホスフィナン-2-オン等)を添加して環化反応を実施した。脱水縮合剤は、化合物(6a')1モルに対して、1モルから過剰モル、好ましくは3モルから5モル用いた。反応時間は1分から6時間、好ましくは5分から1時間である。次いで、この反応液に水と酸化剤(ヨウ素等)を添加して酸化反応を実施した。化合物(6a')1モルに対して、水は0モルから過剰モル、好ましくは30モルから50モル用い、酸化剤は2モルから10モル、好ましくは3モルから5モル用いた。反応時間は5分から12時間、好ましくは30分から3時間である。反応液を炭酸水素ナトリウム水溶液(0.1Mから1Mまで)に加え、15分から24時間攪拌して反応停止処理をした。反応液を有機溶媒(酢酸エチル、ジエチルエーテル、トルエン又はそれらの混合溶媒)で1回から5回抽出した後、抽出液

を併せて無水塩（無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム）で乾燥した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール、酢酸エチル／メタノール、ヘキサン／酢酸エチル等〕、C 1 8シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔緩衝液／アセトニトリル〕又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物（7 a'）を得た。

[0168] A' ' 法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（1' '）で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA' '法に従って製造することができる。

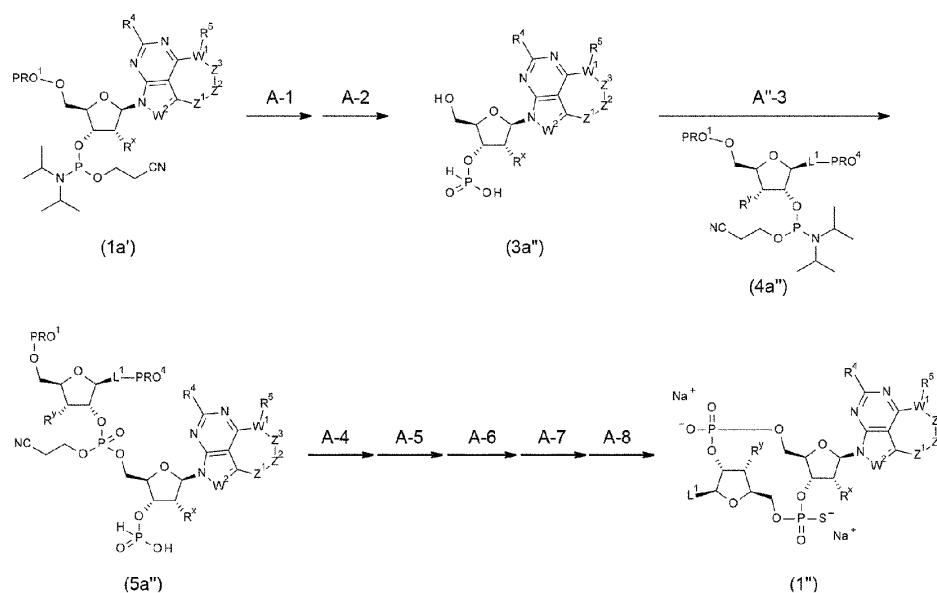
[0169] [化76]



[0170] 本製造法は、A法の一部を変更して一般式（1' '）で表される化合物を製造するための方法である。具体的には、一般式（1' '）の化合物は、A法のA-3工程を以下に示すA' '-3工程に変更して製造することができる。また、置換基R^xとR^yが両方ハロゲン原子の場合は、A-7工程を省略することができる。

[0171]

[化77]



[0172] (A' ' - 3 工程)

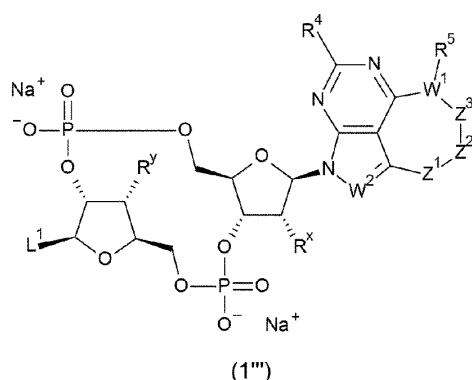
本工程は、式 (3 a' ') の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式 (4 a' ') の化合物とのカップリング反応及び得られたカップリング体の酸化反応を連続して行うことにより、式 (5 a' ') の化合物を製造する工程である。本工程の反応を開始する前に、化合物 (4 a' ') を、脱水アセトニトリルを用いて3回から5回共沸した。最後の共沸時にアセトニトリルを残し、化合物 (4 a' ') の0.01 Mから1 Mのアセトニトリル溶液を調製した。この溶液に乾燥剤 (粉末状又はペレット状のモレキュラーシーブス3 Aもしくはモレキュラーシーブス4 A) を添加し、溶液を使用するまで窒素又はアルゴン雰囲気下で保存した。化合物 (3 a' ') のアセトニトリル溶液に、5℃から35℃までに於いて、共沸により乾燥させた化合物 (4 a' ') のアセトニトリル溶液を添加することによりカップリング反応を実施した。反応時間は、1 分から24 時間、好ましくは5 分から6 時間である。次いで、この反応液に酸化剤 (tert-ブチルヒドロペルオキシド等) を添加して酸化反応を実施した。酸化剤は化合物 (3 a' ') 1モ

ルに対して1モルから5モル、好ましくは2モルから3モル用いた。反応時間は5分間から24時間、好ましくは30分間から6時間である。反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、10分間から12時間攪拌して反応停止処理をした。反応液を有機溶媒（ジクロロメタンとメタノールの混合溶媒等）で1回から5回抽出した後、抽出液を併せて無水塩（無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム）で乾燥した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮し、化合物（5 a' '）の粗体を得た。得られた化合物（5 a' '）の粗体をそのまま次の工程へと進めた。

[0173] A' ' ' 法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（1' ' '）で表されるCDN誘導体は、以下に記載するA' ' '法に従って製造することができる。

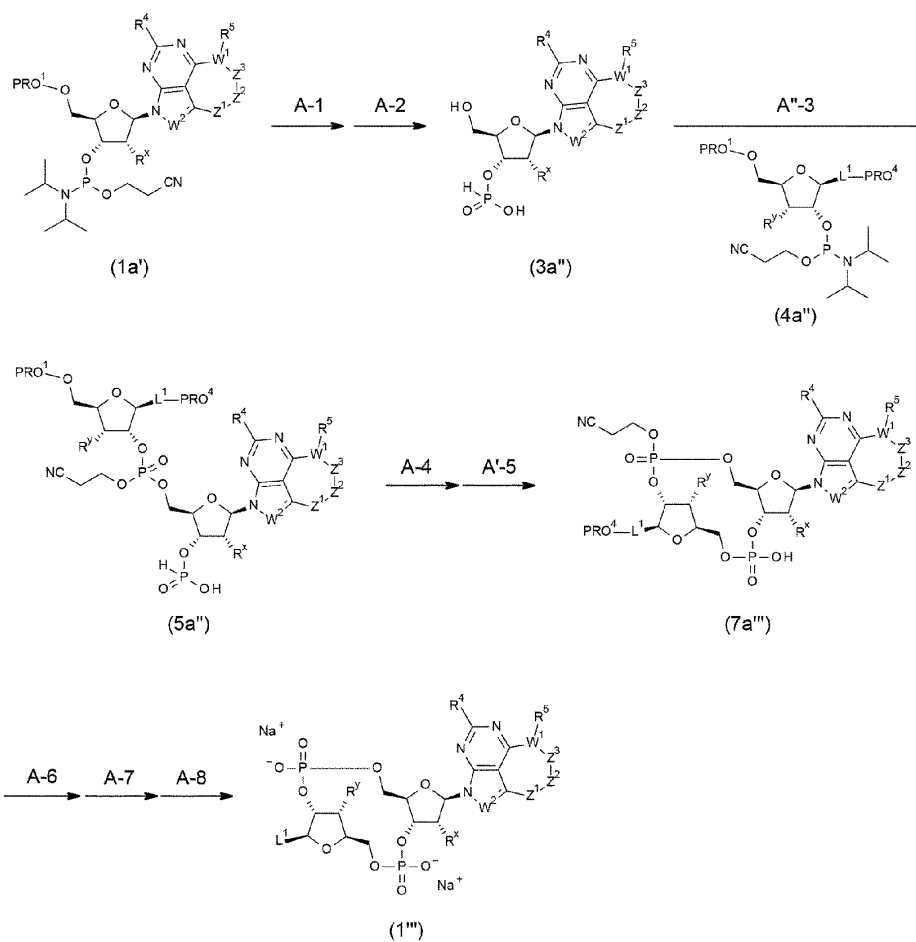
[0174] [化78]



[0175] 本製造法は、A法の一部を変更して一般式（1' ' '）で表される化合物を製造するための方法である。具体的には、一般式（1' ' '）の化合物は、A法のA-3工程をA' '-3工程に、A-5工程をA'-5工程に変更して製造することができる。また、置換基R^xとR^yが両方ハロゲン原子の場合は、A-7工程を省略することができる。

[0176]

[化79]

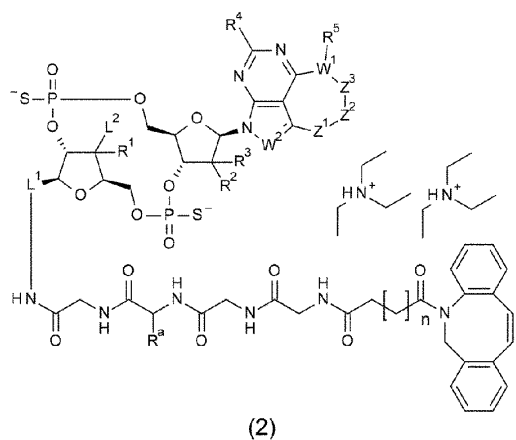


[0177] B法：コンジュゲーション前駆体（糖鎖コンジュゲーション）

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（2）で表されるコンジュゲーション前駆体は、以下に記載するB法に従って製造することができる。

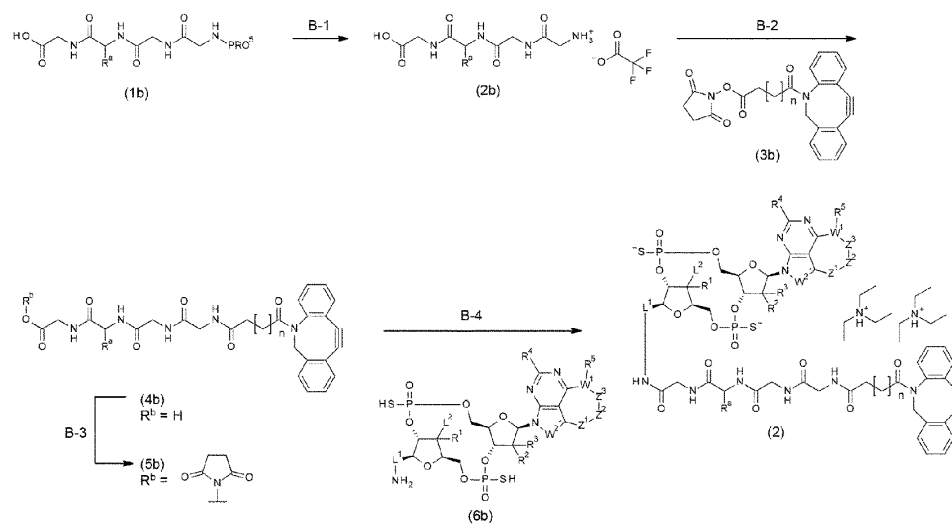
[0178]

[化80]



[0179] 本製造法は、 L^1 の任意の位置に $-NH_2$ が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体(2)を製造するための方法である。

[0180] [化81]



[0181] (B-1工程)

本工程は、式(1b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて保護基を除去することにより、式(2b)の化合物を製造する工程である。PRO⁵がtert-ブチルオキシカルボニル基の場合、化合物(1b)を溶媒(ジクロロメタン、ジオキサン、アセトニトリル、酢酸エチル、テトラヒド

ロフラン、又はそれらの混合溶媒) 中で、 -10°C から反応に用いる溶媒の沸点まで、好ましくは 15°C から 35°C までに於いて、トリフルオロ酢酸で処理することにより保護基を除去した。トリフルオロ酢酸は、化合物(1b) 1モルに対して過剰モル、好ましくは20モルから50モル用いた。反応時間は5分間から24時間、好ましくは30分間から6時間である。反応液を減圧下で濃縮した後、トルエンに懸濁させて再度減圧下で濃縮した。この操作を2回から5回繰り返した。溶媒(ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル又はそれらの混合溶媒)を加えてスラリー状にした後、固体を濾取し、化合物(2b)の粗体を得た。化合物(2b)の粗体は、これ以上の精製をせずに次の工程へと進めた。

[0182] (B-2工程)

本工程は、式(2b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(3b)の化合物とのアミド化を行うことにより、式(4b)の化合物を製造する工程である。化合物(2b)を溶媒(N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、N,N-ジメチルアセトアミド、アセトニトリル等)中で、 5°C から 35°C までに於いて、塩基(トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン等)及び化合物(3b)と反応させることによりアミド化を実施した。化合物(2b) 1モルに対して、塩基は1モルから5モル用い、化合物(3b)は0.5モルから1.5モル用いた。反応時間は10分間から72時間、好ましくは1時間から24時間である。反応液を有機溶媒(ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、メタノール又はその混合溶媒)と水又は酸性水溶液(0.1から1Mの塩酸、クエン酸水溶液等)との二層に注ぎ、有機溶媒で1回から5回抽出した。抽出液を併せて飽和食塩水で洗浄後、無水塩(無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム)で乾燥した。乾燥剤を濾去し濾液を減圧下で濃縮した。なお、上記分液操作を省略し、反応液をそのまま減圧下で濃縮して次のシリカゲルカラム精製へと進めることもできる。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ジクロロメタン/メタノール、酢酸エチル/メタノール等]で精

製し、化合物（４b）を得た。必要に応じて、得られた化合物（４b）を良溶媒（酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン、メタノール又はそれらの混合溶媒）に溶解した後、貧溶媒（ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ヘキサン等）を加えて再沈殿し、固体を濾取することで純度を上げることができる。

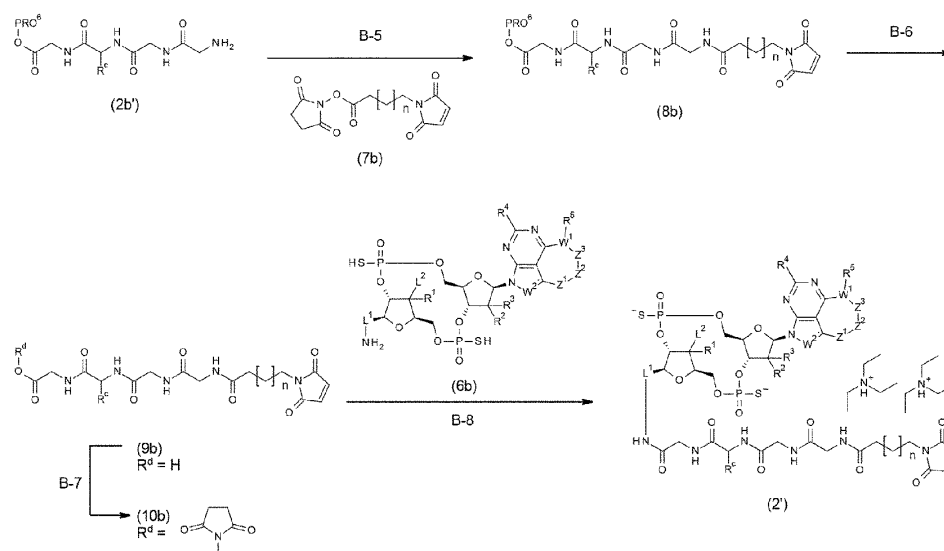
[0183] （B－３工程）

本工程は、式（４b）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてエステル化を行うことによって、式（５b）の化合物を製造する工程である。化合物（４b）を、溶媒（N，N－ジメチルホルムアミド、N，N－ジメチルアセトアミド、N－メチルピロリドン、アセトニトリル等）中で、５℃から３５℃までに於いて、N－ヒドロキシスクシンイミド及び縮合剤（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩等）と反応させることによりエステル化を実施した。N－ヒドロキシスクシンイミド及び縮合剤は、化合物（４b）１モルに対して、それぞれ１モルから３モル用いた。反応時間は３０分間から７２時間、好ましくは２時間から２４時間である。反応液を有機溶媒（ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル又はその混合溶媒）で薄めた後、氷水で３回から５回洗浄した。有機層を無水塩（無水硫酸ナトリウム又は無水硫酸マグネシウム）を用いて乾燥した。乾燥剤を濾去した後、濾液を減圧下で濃縮して化合物（５b）の粗体を得た。必要に応じて、得られた化合物（５b）をC１８シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔アセトニトリルのみ〕で精製してもよい。また、得られた化合物（５b）を良溶媒（酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン又はそれらの混合溶媒）に溶解した後、貧溶媒（ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ヘキサン等）を加えて再沈殿し、固体を濾取することで純度を上げることができる。

[0184] （B－４工程）

本工程は、式（５b）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式（６b）の化合物との縮合反応を行うことにより、式（２）の化合物を製

[0188] [化83]



[0189] (B-5工程)

本工程は、式(2b')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(7b)の化合物とのアミド化を行うことにより、式(8b)の化合物を製造する工程である。塩基を使用しないこと以外は、B法B-2工程に記載された手法に従って化合物(8b)を得た。

[0190] (B-6工程)

本工程は、式(8b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて保護基を除去することにより式(9b)の化合物を製造する工程である。PRO⁶がtert-ブチル基の場合、精製操作にシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール〕を用いること以外は、B法B-1工程に記載された手法にしたがって化合物(9b)を得た。

[0191] (B-7工程)

本工程は、式(9b)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてエステル化を行うことにより、式(10b)の化合物を製造する工程である。B法B-3工程に記載された手法に従って化合物(10b)を得た。

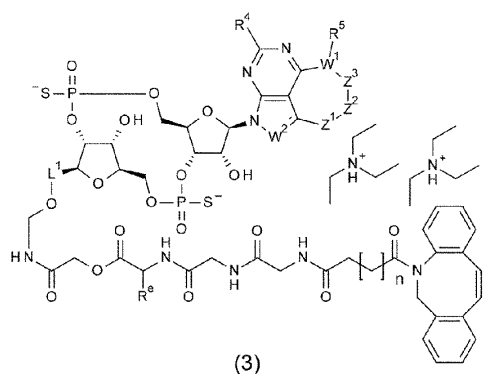
[0192] (B-8工程)

本工程は、式（６ｂ）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式（１０ｂ）の化合物との縮合反応を行うことによって、式（２'）の化合物を製造する工程である。Ｂ法Ｂ－４工程に記載された手法に従って化合物（２'）を得た。

[0193] C法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される（３）で表されるコンジュゲーション前駆体は、以下に記載するＣ法に従って製造することができる。

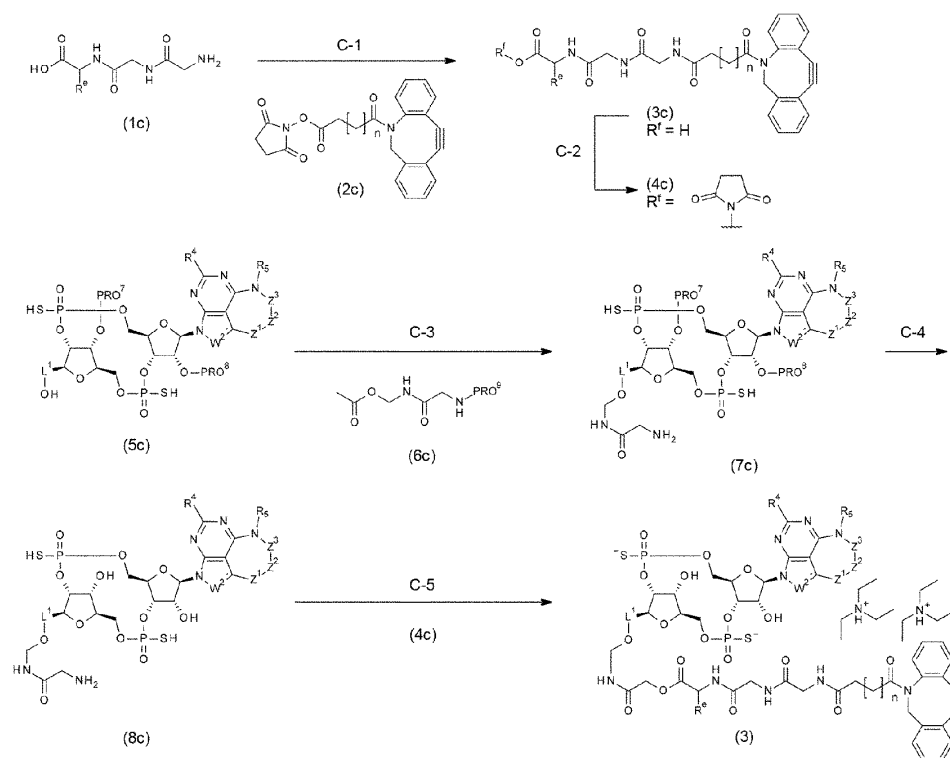
[0194] [化84]



[0195] 本製造法は、L¹の任意の位置にヒドロキシ基が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体（3）を製造するための方法である。

[0196]

[化85]



[0197] (C-1工程)

本工程は、式(1c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(2c)の化合物とのアミド化を行うことにより、式(3c)の化合物を製造する工程である。B法B-2工程に記載された手法に従って化合物(3c)を得た。

[0198] (C-2工程)

本工程は、式(3c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてエステル化を行うことにより、式(4c)の化合物を製造する工程である。B法B-3工程に記載された手法に従って化合物(4c)を得た。

[0199] (C-3工程)

本工程は、式(5c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式(6c)の化合物とのカップリング反応(アミノメチレン化)と得られたカ

ップリング体の脱保護を連続して行うことによって、式(7c)の化合物を製造する工程である。PRO⁹が9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基の場合、化合物(5c)を、テトラヒドロフラン中で、5℃から35℃までに於いて化合物(6c)及び酸(p-トルエンスルホン酸等)と反応させることによりアミノメチレン化を実施した。化合物(5c)1モルに対して、化合物(6c)は1モルから20モル、好ましくは2モルから10モル用い、酸は0.05モルから過剰モル、好ましくは0.1モルから3モル用いた。反応時間は30分間から72時間、好ましくは2時間から24時間である。次いで、反応液に塩基(1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等)を加え、脱保護を実施した。反応液が懸濁している場合には、必要に応じて溶媒(N,N-ジメチルホルムアミド等)を追加して溶解させた後に反応させることができる。塩基は化合物(5c)1モルに対して過剰モル、好ましくは5モルから20モル用いた。反応時間は10分間から24時間、好ましくは2時間から12時間である。反応液に水を加え、そのままC18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[緩衝液/アセトニトリル等]で精製し、化合物(7c)を得た。

[0200] (C-4工程)

本工程は、式(7c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて保護基を除去し、式(8c)の化合物を製造する工程である。PRO⁷及びPRO⁸がtert-ブチルジメチルシリル基の場合、A法A-7工程に記載された手法に従って化合物(8c)を得た。

[0201] (C-5工程)

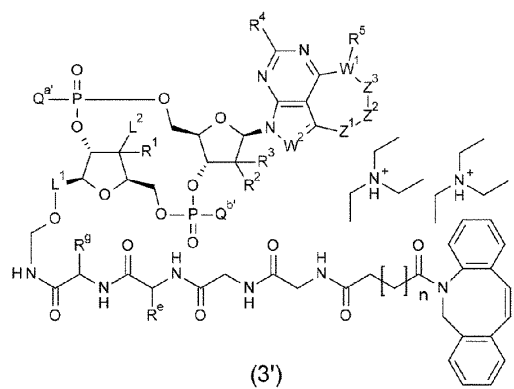
本工程は、式(8c)の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式(4c)の化合物との縮合反応を行うことによって、式(3)の化合物を製造する工程である。B法B-4工程に記載された手法に従って化合物(3)を得た。

[0202] C'法

本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される(3')で表されるコンジ

ユゲーション前駆体は、以下に記載するC'法に従って製造することができる。

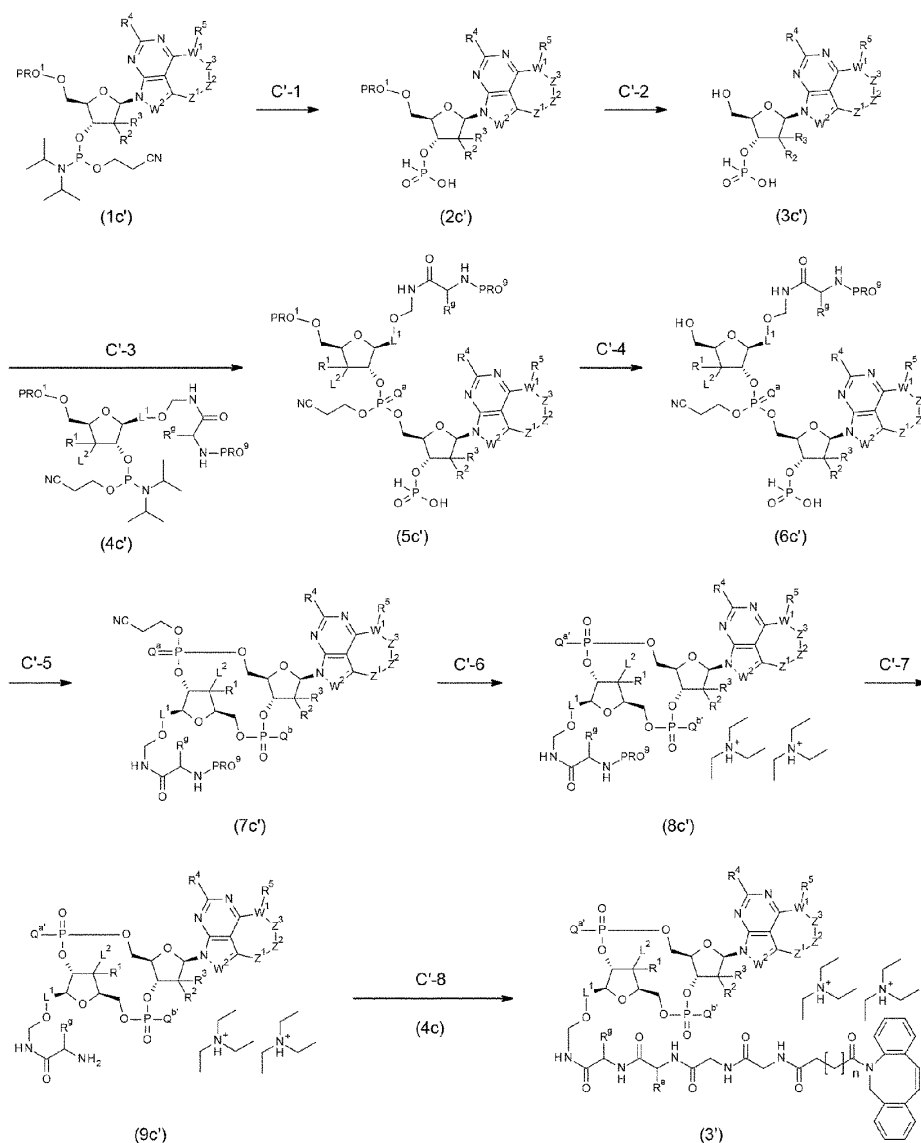
[0203] [化86]



[0204] 本製造法は、L¹の任意の位置にヒドロキシ基が置換されている場合のコンジュゲーション前駆体（3'）を製造するための方法である。

[0205]

[化87]



[0206] (C' - 1 工程)

本工程は、式(1c')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて加水分解反応とシアノエチル基の除去を連続して行うことにより、式(2c')の化合物を製造する工程である。A法A-1工程に記載された手法に従って化合物(2c')を得た。

[0207] (C' - 2 工程)

本工程は、式（2 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式（3 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-2工程に記載された手法に従って化合物（3 c'）を得た。

[0208]（C' - 3工程）

本工程は、式（3 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて式（4 c'）の化合物とのカップリング反応及び得られたカップリング体の硫化反応又は酸化反応を連続して行うことにより、式（5 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-3工程又はA'法A'-3工程に記載された手法に従って化合物（5 c'）を得た。

[0209]（C' - 4工程）

本工程は、式（5 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてヒドロキシ基の保護基を除去し、式（6 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-4工程に記載された手法に従って化合物（6 c'）を得た。

[0210]（C' - 5工程）

本工程は、式（6 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて環化反応と硫化反応又は酸化反応を連続して行い、式（7 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-5工程又はA'法A'-5工程に記載された手法に従って化合物（7 c'）を得た。

[0211]（C' - 6工程）

本工程は、式（7 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いてシアノエチル基及び全てのアシル系保護基を同時に除去し、式（8 c'）の化合物を製造する工程である。A法A-6工程に記載された手法に従って化合物（8 c'）を得た。

[0212]（C' - 7工程）

本工程は、式（8 c'）の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて全てのシリル系保護基を同時に除去し、式（9 c'）の化合物を製造する工程である。PRO⁹が2-（トリメチルシリル）エトキシカルボニル基の場合、化合物（8 c'）を、5℃から100℃まで、好ましくは35℃から60℃

までに於いて、フッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液で処理することにより、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル基を除去した。フッ化テトラブチルアンモニウムは、化合物(8c') 1モルに対して過剰モル、好ましくは10から30モル用いた。反応時間は1時間から48時間、好ましくは4時間から24時間である。反応液に緩衝液を加えて希釈後、必要に応じて有機溶媒成分を減圧下で留去した。残留物を分取HPLC[緩衝液/アセトニトリル、緩衝液/メタノール等]、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[緩衝液/アセトニトリル、緩衝液/メタノール等]又はそれらを組み合わせることにより精製し、化合物(9c')を得た。

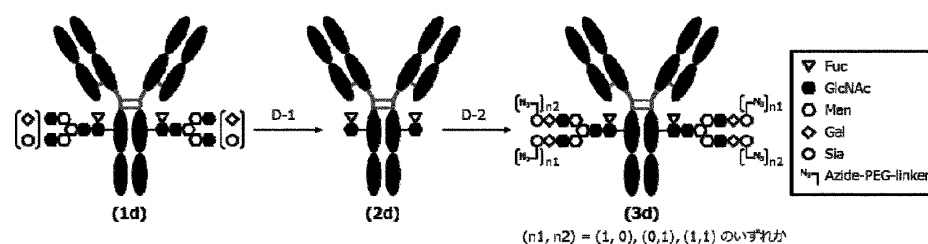
[0213] (C' - 8工程)

本工程は、式(9c')の化合物に対して公知の有機化学的手法を用いて、式(4c)の化合物との縮合反応を行うことによって、式(3')の化合物を製造する工程である。B法B-4工程に記載された手法に従って化合物(3')を得た。

[0214] D法：糖鎖リモデリング抗体の製造

糖鎖リモデリング抗体は、例えばWO2018/003983などに記載の方法に準じて、次式に示す方法で製造することができる。

[0215] [化88]



[0216] (D - 1工程)

本工程は、目的の抗体に対して、公知の酵素反応を用いて抗体のアミノ酸配列297番目のアスパラギンに結合するN結合型糖鎖(N297結合糖鎖)の還元末端キトビオース構造のGlcNAc β 1-4GlcNAc間のグ

リコシド結合を加水分解により切断し、糖鎖切断抗体を製造する工程である。目的の抗体（1 d）（10 mg/mL）を緩衝液（リン酸緩衝液等）中、0℃から40℃までにおいて、野生型EndoS酵素等の加水分解酵素を用いて還元末端のキトビオース構造のGlcNAc β 1と4GlcNAc間のグリコシド結合の加水分解反応を実施した。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。野生型EndoS酵素は抗体（1 d）100 mgに対して、0.1 mgから10 mg、好ましくは0.1 mgから3 mgを用いた。反応終了後、アフィニティークロマトグラフィー（HiTrap rProtein A FF（5 ml）（GEヘルスケア製））及び／又はハイロドキシアパタイトカラム（Bio-Scale Mini CHT Type Iカートリッジ（5 ml）（BIO-RAD製））で精製し、（Fuc α 1, 6）GlcNAc抗体（2 d）を得た。

[0217] （D-2工程）

本工程は、D-1工程で得られた（Fuc α 1, 6）GlcNAc抗体（2 d）に対し、公知の酵素反応を用いてアジド基を含むPEGリンカーを有するSG型又はMSG（MSG1、MSG2）型糖鎖オキサゾリン体（以下、「アジド糖鎖オキサゾリン体」）を結合させ、糖鎖リモデリング抗体（3 d）を製造する工程である。

[0218] 抗体（2 d）を緩衝液（リン酸緩衝液等）中、0℃から40℃までにおいて、EndoS（D233Q/Q303L）等の糖転移酵素存在下、アジド糖鎖オキサゾリン体と反応させることで、糖鎖転移反応を実施した。反応時間は10分から72時間、好ましくは1時間から6時間である。EndoS酵素（D233Q/Q303L）は抗体100 mgに対して、1 mgから10 mg、好ましくは1 mgから3 mgを用い、アジド糖鎖オキサゾリン体は2当量から過剰当量、好ましくは4当量から20当量用いた。反応終了後、アフィニティークロマトグラフィー（HiTrap rProtein A FF（5 ml）（GEヘルスケア製））及びハイロドキシアパタイトカラム（Bio-Scale Mini CHT Type Iカートリッジ（

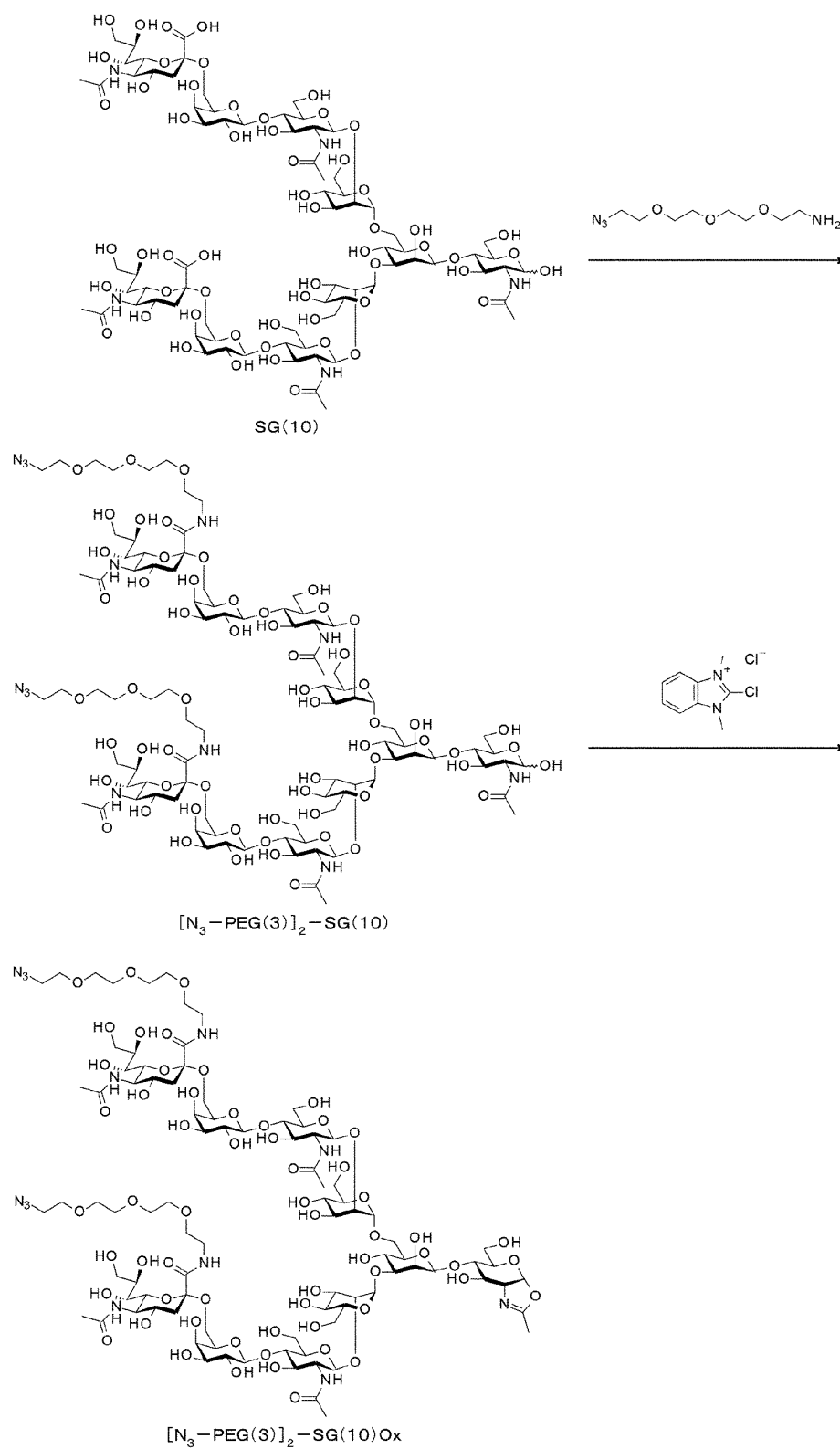
5 ml) (BIO-RAD製)) で精製し、糖鎖リモデリング抗体 (3 d) を得た。

[0219] 上記の糖鎖リモデリング抗体の調製において、抗体水溶液の濃縮、濃度測定、並びにバッファー交換は、後述の共通操作 A から C に従って行うことができる。

[0220] なお、SG 型のアジド糖鎖オキサゾリン体は WO 2018/003983 に記載の方法に準じて合成した。一例として $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)-Ox$ (WO 2018/003983 に記載の化合物 1-10) の合成方法を次式に示す。

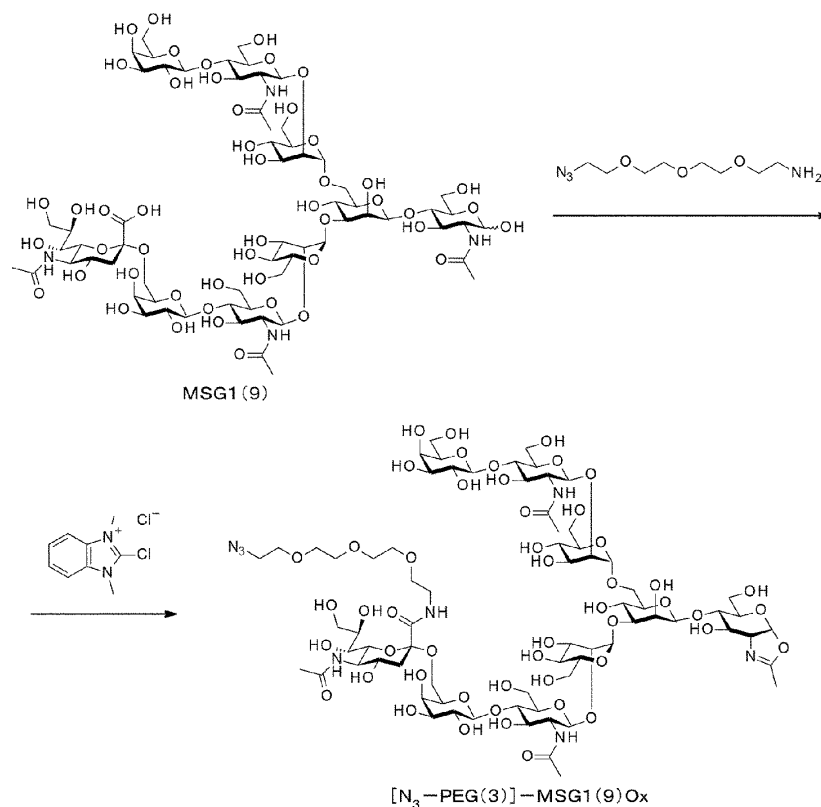
[0221]

[化89]



[0222] MSG型のアジド糖鎖オキサゾリン体もWO2018/003983に記載の方法に準じて合成した。一例として $[N_3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox$ (WO2018/003983に記載の化合物1-11)の合成方法を次式に示す。

[0223] [化90]



E法：抗体と薬物のコンジュゲーション（糖鎖コンジュゲーション1）

[0224]

トアミド、N-メチルピロリドン、プロピレングリコール又はそれらの混合溶媒)に溶解させた溶液を混合することで、SPAAC反応を実施した。コンジュゲーション前駆体(2)は、糖鎖リモデリング抗体(3d)1モルに対して、2モルから過剰モル、好ましくは4モルから30モルであり、有機溶媒の比率は、抗体の緩衝溶液に対し1%から200%(v/v)が好ましい。反応温度は0℃から37℃、好ましくは15℃から25℃であり、反応時間は1時間から150時間、好ましくは6時間から72時間である。反応溶液のpHは5から9が好ましい。反応溶液を後述の共通操作Dに記載の方法に従って精製し、抗体薬物コンジュゲート(1e)を得た。

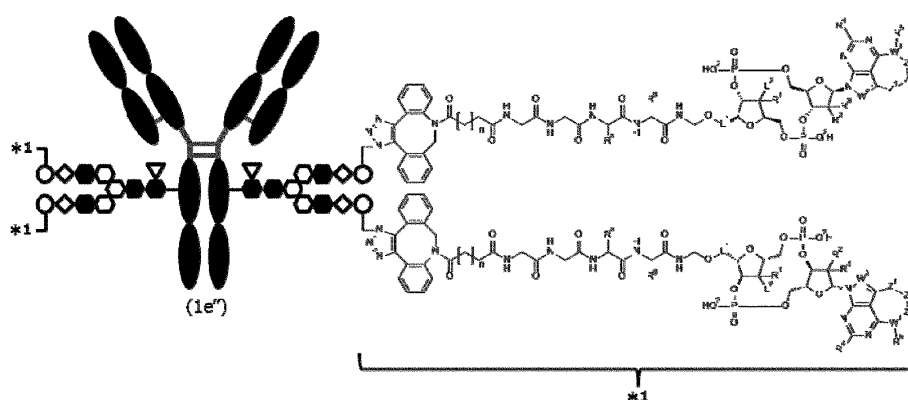
[0226] E'法: 抗体と薬物のコンジュゲーション(システインコンジュゲーション)

システインコンジュゲーションを有する本発明の抗体薬物コンジュゲートは、参考例3等に従って調製した目的の抗体とB'法B-8工程で得られたマレイミド基を有するコンジュゲーション前駆体(2')を用いて、WO2014/057687などに記載の方法に準じて製造することができる。

[0227] E''法: 抗体と薬物のコンジュゲーション(糖鎖コンジュゲーション2)

E法において、コンジュゲーション前駆体(2)をC'法C'-8工程で得られたコンジュゲーション前駆体(3')に変えることによって、次式に示す抗体薬物コンジュゲート(1e'')を得た。

[0228] [化92]



(ここで、抗体薬物コンジュゲート (1 e' ') の左側の2つのアステリスク (*¹) には右側のアステリスクで示される薬物リンカー部分を示す。)

[0229] 抗体薬物コンジュゲートは、後述の共通操作DからGによってバッファー交換、精製、抗体濃度の測定及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体薬物コンジュゲートの同定を行うことができる。

[0230] 共通操作A：抗体水溶液の濃縮

Amicon (登録商標) Ultra遠心式フィルターデバイス (50,000 NMWL, Merck Millipore Ltd.) に抗体又は抗体薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機 (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.) を用いた遠心操作 (2000Gから4000Gで5分間から20分間遠心) により、抗体及び抗体薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

[0231] 共通操作B：抗体の濃度測定

UV測定器 (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる280nm吸光係数 ($1.3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ から $1.8 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いた。

[0232] 共通操作C：抗体のバッファー交換

抗体水溶液に緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0)、リン酸緩衝液 (pH 6.0) 等) を加え、共通操作Aに記載の方法に従って濃縮した。この操作を数回行った後、共通操作Bに記載の方法に従って抗体濃度を測定した。この抗体緩衝溶液に、適宜緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0)、リン酸緩衝液 (pH 6.0) 等) を加えて、目的の濃度 (例えば、約 10 mg/mL) の抗体緩衝溶液を調製した。

[0233] 共通操作D：抗体薬物コンジュゲートの精製 (ゲル濾過クロマトグラフィー)

酢酸緩衝液 (10 mM Acetate Buffer, 5% Sorbitol, pH 5.5 ; 本明細書ではABSと称する) 又はそれ以外の適当

な緩衝液でNAPカラム（NAP-5，NAP-10，NAP-25（GEヘルスケア製））を平衡化させた。このNAPカラムに、抗体薬物コンジュゲート反応溶液をチャージし、メーカー規定量の緩衝液を自然流下させ、抗体画分を分取した。この画分を再度NAPカラムにチャージし、メーカー規定量の緩衝液を自然流下させ、抗体画分を分取した。この操作を合計2回から3回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーやジメチルスルホキシド、プロピレングリコールを除いた抗体薬物コンジュゲートを得た。必要に応じて、共通操作A及びCにより抗体薬物コンジュゲート溶液の濃度を調節した。

[0234] 共通操作E：抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（UV法）

抗体薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、吸光光度計（UV/VIS Spectrometer Lambda 25, PerkinElmer, Inc.）を用いて、抗体薬物コンジュゲート水溶液の280nm及び250nmの二波長における吸光度を測定した後に、下記の計算を行うことで算出することができる。ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい（吸光度の加成性）ことから、抗体と薬物とのコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

$$A_{280} = A_{D, 280} + A_{A, 280} = \epsilon_{D, 280} C_D + \epsilon_{A, 280} C_A \quad \text{式(1)}$$

$$A_{250} = A_{D, 250} + A_{A, 250} = \epsilon_{D, 250} C_D + \epsilon_{A, 250} C_A \quad \text{式(11)}$$

ここで、 A_{280} は280nmにおける抗体薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、 A_{250} は250nmにおける抗体薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、 $A_{A, 280}$ は280nmにおける抗体の吸光度を示し、 $A_{A, 250}$ は250nmにおける抗体の吸光度を示し、 $A_{D, 280}$ は280nmにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、 $A_{D, 250}$ は250nmにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、 $\epsilon_{A, 280}$ は280nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{A, 250}$ は250nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、

$\varepsilon_{D, 280}$ は280 nmにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、 $\varepsilon_{D, 250}$ は250 nmにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、 C_A は抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、 C_D は抗体薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。ここで、 $\varepsilon_{A, 280}$ 、 $\varepsilon_{A, 250}$ 、 $\varepsilon_{D, 280}$ 、 $\varepsilon_{D, 250}$ は、事前に用意した値（計算推定値又は実測値）が用いられる。例えば、 $\varepsilon_{A, 280}$ は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423）によって推定することができる。 $\varepsilon_{A, 250}$ は、抗体のUV測定から得られた実測値と $\varepsilon_{A, 280}$ の推定値から計算した値を用いた。実施例において、抗TROP2抗体1のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{A, 280}=223400$ 及び $\varepsilon_{A, 250}=63482$ を用いた。抗TROP2抗体2のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{A, 280}=223400$ 及び $\varepsilon_{A, 250}=69027$ 又は71411を用いた。抗CD70抗体1のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{A, 280}=226380$ 及び $\varepsilon_{A, 250}=73432$ を用いた。抗CD70抗体2のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{A, 280}=212400$ 及び $\varepsilon_{A, 250}=72355$ を用いた。抗EGFR抗体1のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{A, 280}=203460$ 及び $\varepsilon_{A, 250}=62692$ を用いた。抗EGFR抗体2のモル吸光係数は、 $\varepsilon_{A, 280}=217440$ 及び $\varepsilon_{A, 250}=75731$ を用いた。 $\varepsilon_{D, 280}$ 及び $\varepsilon_{D, 250}$ は、用いるコンジュゲート前駆体をあるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。実施例におけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数は、都度UV測定で得た。抗体薬物コンジュゲート水溶液の A_{280} 及び A_{250} を測定し、これらの値を式（I）及び（II）に代入して連立方程式を解くことによって、 C_A 及び C_D を求めることができる。さらに C_D を C_A で除することによって、抗体一分子あたりの薬物平均結合数を求めることができる。

[0235] 共通操作F：抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（逆相高速液体クロマトグラフィー法：RP-HPLC）

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の共通操作Eに加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー分析によって求めることができる。

[0236] [F-1. HPLC分析用サンプルの調製（抗体薬物コンジュゲートの還元）]

抗体薬物コンジュゲート溶液（約1 mg/mL、60 μ L）をジチオトレイトール（DTT）水溶液（100 mM、15 μ L）と混合した。混合物を37°Cで30分間インキュベートして、抗体薬物コンジュゲートのL鎖及びH鎖間のジスルフィド結合を切断した。この反応溶液をそのままHPLC分析に用いた。

[0237] [F-2. HPLC分析]

代表的な分析条件は下記の通り。

HPLCシステム：Agilent 1290 HPLCシステム（Agilent Technologies）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280 nm）

カラム：Acquity BEH Phenyl（2.1×50 mm、1.7 μ m、Waters製）

カラム温度：75°C

流速：0.8 mL/min

サンプル注入量：10 μ L

移動相A：0.1%トリフルオロ酢酸（TFA），15%イソプロピルアルコール水溶液

移動相B：0.075%TFA，15%イソプロピルアルコールアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム（移動相B）：14%－36%（0分－15分），36%－80%（15－17分），80%－14%（17分－17.1分），14%－14%（17.1分－23分）

[0238] [F-3. データ解析]

〔F-3-1〕SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、薬物の結合していない抗体のL鎖（L0）及びH鎖（H0）に対して、薬物の結合したH鎖（薬物が一つ結合したH鎖：H1、薬物が二つ結合したH鎖：H2）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、原則的にL0、H0、H1、H2の順に溶出される。L0及びH0との保持時間を比較することにより検出ピークをL0、H0、H1、H2のいずれかに割り当てることができる。システインコンジュゲーションの場合も同様に、薬物の結合したL鎖（薬物が一つ結合したL鎖：L1）と薬物の結合したH鎖（薬物が一つ結合したH鎖：H1、薬物が二つ結合したH鎖：H2、薬物が三つ結合したH鎖：H3）は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、原則的にL0、L1、H0、H1、H2、H3の順に溶出される。L0及びH0との保持時間を比較することにより検出ピークをL0、L1、H0、H1、H2、H3のいずれかに割り当てることができる。

[0239] 〔F-3-2〕薬物リンカーにUV吸収があるため、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、薬物リンカーの結合数に応じて、H鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積の補正を行った。L鎖にも薬物が結合するシステインコンジュゲーションの場合は、L鎖に対しても同様にピーク面積の補正を行った。

[0240] [数1]

$$\text{H鎖ピーク面積補正值 (HPA}_i\text{)} = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{H鎖のモル吸光係数}}{\text{H鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0241] ここで、各抗体におけるL鎖及びH鎖のモル吸光係数（280nm）は、共通操作Eに記載した既知の計算方法で算出した推定値を用いた。抗TROP2抗体1及び抗TROP2抗体2の場合、L鎖のモル吸光係数として27702を、H鎖のモル吸光係数として83998を用いた。抗CD70抗体1の場合、L鎖のモル吸光係数として30222を、H鎖のモル吸光係数として82968を用いた。抗CD70抗体2の場合、L鎖のモル吸光係数とし

て30222を、H鎖のモル吸光係数として75978を用いた。抗EGFR抗体1の場合、L鎖のモル吸光係数として23232を、H鎖のモル吸光係数として78498を用いた。抗EGFR抗体2の場合、L鎖のモル吸光係数として30222を、H鎖のモル吸光係数として78498を用いた。薬物リンカーのモル吸光係数(280nm)は、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体の実測値を用い、システインコンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体をメルカプトエタノール又はN-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をスクシンイミドチオエーテルに変換した化合物の実測値を用いた。

[0242] [F-3-3] ピーク面積補正值合計に対する各鎖ピーク面積比(%)を下式に従って計算した。

[0243] [数2]

$$\text{H鎖ピーク面積比}(\% \text{HPA}_i) = \frac{\text{HPA}_i}{\text{HPA}_0 + \text{HPA}_1 + \text{HPA}_2} \times 100$$

[0244] [F-3-4] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数(DAR)を、下式に従って計算した。

[0245] [数3]

$$\text{薬物平均結合数 (DAR)} = \frac{0 \times \% \text{HPA}_0 + 1 \times \% \text{HPA}_1 + 2 \times \% \text{HPA}_2}{100} \times 2$$

[0246] [F-3-5] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を、下式に従って計算した。

[0247] [数4]

$$\text{抗体濃度} (C_A) [\text{mg/mL}] = \frac{\text{抗体薬物複合体の吸光度} \times \text{希釈倍数} \times \text{抗体の分子量}}{\text{抗体のモル吸光係数} + \text{薬物平均結合数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0248] ここで抗体薬物複合体の吸光度(280nm)は、抗体薬物コンジュゲート水溶液の実測値を用いた。希釈倍数は、吸光度を測定する際に抗体薬物コンジュゲート水溶液を何倍に希釈したかを示し、通常4倍希釈である。抗体のモル吸光係数(280nm)は、共通操作Eに記載した既知の計算方法で算出した推定値を用いた。薬物平均結合数は[F-3-4]で得られた値を用

いた。薬物リンカーのモル吸光係数（280nm）は、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体の実測値を用い、システインコンジュゲーションの場合は、コンジュゲーション前駆体をメルカプトエタノール又はN-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をスクシンイミドチオエーテルに変換した化合物の実測値を用いた。

[0249] 共通操作G：抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（疎水性相互作用－高速液体クロマトグラフィー法：HIL-HPLC）

抗体薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の共通操作E及びFに加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー分析によって求めることができる。

[0250] [G-1. HPLC分析用サンプルの調製]

抗体薬物コンジュゲート溶液（約1mg/mL、60μL）をそのままHPLC分析に用いた。

[0251] [G-2. HPLC分析]

代表的な分析条件は下記の二通り。

HPLCシステム：SHIMADZU CBM-20A（島津製作所）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280nm）

カラム：TSK-gel Butyl-NPR（4.6×100mm，2.5μm，TOSOH製）

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相A：1.5M硫酸アンモニウム含有25mMリン酸緩衝液（pH=7.0）

移動相B：25mMリン酸緩衝液（pH=7.0）／イソプロピルアルコール混合液（3：1）

流速：0.8mL/min

サンプル注入量：15μL

グラジエントプログラム（移動相B）：10%－15%（0分－5分），1

5%－65%（5分－20分）

又は

HPLCシステム：SHIMADZU CBM-20A（島津製作所）

検出器：紫外吸光度計（測定波長：280nm）

カラム：PolyPROPYL A（4.6×100mm，3μm，1500Å，PolyLC製）

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相A：1.5M硫酸アンモニウム含有20mMリン酸緩衝液（pH＝7.4）

移動相B：20mMリン酸緩衝液（pH＝7.4）

流速：0.8mL/min

サンプル注入量：15μL

グラジエントプログラム（移動相B）：40%－80%（0分－20分）

[0252] [G-3. データ解析]

[G-3-1] 抗体に結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、SPAAC反応での糖鎖コンジュゲーションの場合は、原則的にDAR＝0、DAR＝2、DAR＝4の順に溶出される。DAR＝0との保持時間を比較することにより、検出ピークをDAR＝2及びDAR＝4のいずれかに割り当てることができる。抗体や薬物リンカーの種類に依存してDAR＝1及びDAR＝3のピークが検出されることもある。検出ピークのDARは、HIL-PLCで当該ピークを分画後、マスペクトルを測定して推定することもある。

[0253] [G-3-2] 薬物リンカーにUV吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、抗体及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行った。

[0254] [数5]

$$\text{抗体ピーク面積補正值 (WPA}_i\text{)} = \text{ピーク面積} \times \frac{\text{抗体のモル吸光係数}}{\text{抗体のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0255] ここで、抗体のモル吸光係数（280 nm）は、共通操作 E に記載した既知の計算方法で算出した推定値を用いた。薬物リンカーのモル吸光係数（280 nm）は、コンジュゲーション前駆体の実測値を用いた。

[0256] [G-3-3] ピーク面積補正值合計に対する抗体ピーク面積比（%）を下式に従って計算した。

[0257] [数6]

$$\text{抗体ピーク面積比 (\%WPA}_i\text{)} = \frac{\text{WPA}_i}{\text{WPA}_0 + \text{WPA}_1 + \text{WPA}_2 + \text{WPA}_3 + \text{WPA}_4} \times 100$$

[0258] [G-3-4] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算した。

[0259] [数7]

$$\text{薬物平均結合数 (DAR)} = \frac{0 \times \%WPA_0 + 1 \times \%WPA_1 + 2 \times \%WPA_2 + 3 \times \%WPA_3 + 4 \times \%WPA_4}{100}$$

[0260] [G-3-5] 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度は、[F-3-5] に記載の式に従って計算した。その際、薬物平均結合数は[G-3-4] で得られた値を用いた。

[0261] 本発明の抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体には、立体異性体あるいは不斉炭素原子に由来する光学異性体、幾何異性体、互変異性体又は d 体、l 体、アトロプ異性体等の光学異性体が存在することもあるが、これらの異性体、光学異性体及びこれらの混合物のいずれも本発明に含まれる。

[0262] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおいて、抗体 1 分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体薬物コンジュゲートの製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体 1 分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数（DAR）として特定することができる。抗体分子への環状ジヌクレオチド誘導体の結合数はコントロール可能であり、1 抗体あたりの薬物平均結合数として、1 から 10 の範囲の環状ジヌクレオチド誘導体を結合させることができるが

、好ましくは1から8個であり、より好ましくは1から5個である。

[0263] 本発明の抗体薬物コンジュゲートにおいて、抗体A bが、抗体A bのリモデリングされた糖鎖からLに結合している場合、抗体薬物コンジュゲートにおける抗体1分子あたりの薬物結合数 m^2 は1または2の整数である。当該糖鎖がN297糖鎖であり、糖鎖がN297-(Fuc)SGの場合、 m^2 は2であり、DARは3～5の範囲（好ましくは、3.2～4.8の範囲であり、より好ましくは、3.5～4.2の範囲）である。N297糖鎖がN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2又はN297-(Fuc)MSG1とN297-(Fuc)MSG2の混合物の場合、 m^2 は1であり、DARは1～3の範囲（好ましくは、1.0～2.5の範囲、より好ましくは、1.2～2.2の範囲）である。

[0264] なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、環状ジヌクレオチド誘導体の結合数をコントロールした抗体を取得することができる。

[0265] なお、本発明の抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体は、大気中に放置したり、又は再結晶することにより、水分を吸収し、吸着水がついたり、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物及び塩も本発明に包含される。

[0266] 本発明の抗体薬物コンジュゲート又はその製造中間体が、アミノ基等の塩基性基を有する場合、所望により医薬的に許容される塩とすることができる。そのような塩としては、例えば塩酸塩、ヨウ化水素酸塩等のハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩等の低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等のアリールスルホン酸塩；ギ酸、酢酸、リンゴ酸、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及びオルニチン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩等のアミノ酸塩を挙げることができる。

[0267] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、リン酸基及び／又はチオリン酸基をその構造に含むため、一般的に塩基付加塩を形成することが可能である。また、その製造中間体が、カルボキシ基等の酸性基を有する場合も、一般的に塩基付加塩を形成することが可能である。医薬的に許容される塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩等の無機塩；ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシナルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジリエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-N-(2-フェニルエトキシ)アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩等の有機アミン塩、等を挙げることができる。

[0268] 本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体は、空気中の水分を吸収すること等により水和物として存在することもある。本発明の溶媒和物としては、医薬的に許容し得るものであれば特に限定されないが、具体的には、水和物、エタノール和物、2-プロパノール和物等が好ましい。また、本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体中に窒素原子が存在する場合にはN-オキシド体となってもよく、これら溶媒和物及びN-オキシド体も本発明の範囲に含まれる。また、本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体中に硫黄原子が存在する場合にはスルホキシド体となってもよく、これら溶媒和物及びスルホキシド体も本発明の範囲に含まれる。

[0269] また、本発明には、種々の放射性または非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の抗体薬物コンジュゲート及びその製造中間体を構成する原子の1以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位体としては、例えば、重水素(2H)、トリチウム(3H)、ヨウ素-125(125I)または炭素-14(14C)等を挙げることができる。また

、本発明化合物は、例えば、トリチウム（ ^3H ）、ヨウ素-125（ ^{125}I ）または炭素-14（ ^{14}C ）のような放射性同位体で放射性標識され得る。放射性標識された化合物は、治療または予防剤、研究試薬、例えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。本発明の抗体薬物コンジュゲートの全ての同位体変異種は、放射性である与否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

[0270] <4. 医薬>

本発明の抗体薬物コンジュゲートは、がん細胞に対して抗腫瘍免疫活性又は細胞傷害活性を示すことから、医薬として、特にがんに対する治療剤及び／又は予防剤、又は抗腫瘍剤として使用することができる。

[0271] 本発明の抗体薬物コンジュゲートが適用されるがんの種類としては、肺がん（非小細胞肺がん、小細胞肺がん等）、腎がん、尿路上皮がん、大腸がん、前立腺がん、多形神経膠芽腫、卵巣がん（表層上皮性腫瘍、間質性腫瘍、胚細胞腫瘍等）、膵がん、乳がん、メラノーマ、肝がん、膀胱がん、胃がん、食道がん、子宮体がん、精巣がん（セミノーマ、非セミノーマ）、子宮頸がん、胎盤絨毛がん、脳腫瘍、頭頸部がん、甲状腺がん、中皮腫、消化管間質腫瘍（Gastrointestinal Stromal Tumor、GIST）、胆のうがん、胆管がん、副腎がん、咽頭がん、舌がん、聴器がん、胸腺がん、小腸がん、有棘細胞がん、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨髓腫、肉腫等を挙げることができるが、抗体薬物コンジュゲートについては、治療対象となるがん細胞において抗体薬物コンジュゲート中の抗体が認識できる蛋白質を発現しているがん細胞であればこれらには限定されることはない。

[0272] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、哺乳動物はより好ましくはヒトである。

[0273] 本発明の抗体薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。

- [0274] 本発明の抗体薬物コンジュゲートは、1種以上の薬学的に適合性の成分を含む医薬組成物として投与され得る。例えば、上記医薬組成物は、代表的には、1種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体（例えば、水および油（石油、動物、植物、または合成起源の油（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、ごま油など））を含む）を含む。水は、上記医薬組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。その処方は、投与の態様に対応する。
- [0275] 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗体薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下の経路が挙げられるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入またはボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記抗体薬物コンジュゲートの投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。
- [0276] 代表的実施形態において、上記抗体薬物コンジュゲートを含む医薬組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封してシールされた容器中の凍結乾燥粉末または無水の濃縮物として、別個に、または単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬組成物が注入によって投与される予定である場合、それ

は、例えば、滅菌の製薬グレードの水または食塩水を含む注入ボトルで投薬され得る。上記医薬が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。上記医薬組成物は、溶液として提供される場合もある。

[0277] 本発明の医薬組成物は本発明の抗体薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいし、本発明の抗体薬物コンジュゲート及び他の癌治療剤を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、他の癌治療剤と共に、又は組み合わせて、投与することもでき、これによって抗腫瘍効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の癌治療剤は、抗体薬物コンジュゲートと同時に、別々に、あるいは連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このような癌治療剤として、代謝拮抗剤、アルキル化剤、微小管阻害剤等の化学療法剤 (abraxane、carboplatin、cisplatin、gemcitabine、irinotecan (CPT-11)、paclitaxel、docetaxel、pemetrexed、vinblastine又は国際公開第WO2003/038043号パンフレットに記載の薬剤等)、ホルモン調整薬 (LH-RHアナログであるリュープロレリン等、ゴセレリン、エストラムスチン、エストロジェン拮抗薬であるタモキシフェン、ラロキシフェン等)、アロマターゼ阻害剤 (アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等)、キナーゼ阻害剤、PARP阻害剤、骨破壊抑制剤、骨形成促進剤、転移抑制剤、分子標的薬 (抗EGFR抗体、抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体等)、免疫チェックポイント阻害薬 (抗PD-1抗体であるニボルマブ、ペンブロリズマブ等、抗PD-L1抗体であるアテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ等、抗PD-L2抗体、抗CTLA4抗体であるイピリムマブ等、抗A2aR抗体、A2a受容体アンタゴニスト、抗LAG3抗体、抗TIM3抗体等)、抗制御性T細胞薬 (抗CTLA4抗体、抗CD25抗体、抗GITR抗体、抗GARP抗体、抗TIM3抗体、抗CCR8抗体等)、免疫活性化剤 (抗4-1BB抗

体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2アナログ、サイトカイン、TLRアゴニスト等）、免疫調節剤（抗CD47抗体、抗SIRP α 抗体、抑制性ミエロイド調整剤等）、ADCC（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity）活性、ADCP（Antibody Dependent Cellular Phagocytosis）活性または補体活性をもつ抗体医薬、BiTE（Bi-specific T-cell engagers）、Antibody-Drug-Conjugate（ADC）（例えば、Deruxtecan、DM1、Pyrralobenzodiazepine、MMAF等を含む薬剤コンジュゲート（抗HER2-ADC、抗TROP2-ADC、抗HER3-ADC等））、光力学療法を組み合わせたADC等、さらに抗腫瘍ワクチン、抗腫瘍細胞治療（CAR-T、TCR-T、樹状細胞、NK細胞等）、抗腫瘍細菌治療、抗腫瘍ウイルス治療等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。さらに、本発明の抗体薬物コンジュゲートは、本発明の他の抗体薬物コンジュゲートと共に投与することもでき、これによって抗腫瘍効果を増強させることができる。また、本発明の抗体薬物コンジュゲートは薬物だけでなく、抗腫瘍効果をもたらす治療、例えば放射線、重量子線、外科的手術、骨髄移植等との併用によって抗腫瘍効果を増強させることができるが、抗腫瘍効果を有する治療であれば限定されることはない。

[0278] このような医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤あるいは液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

[0279] 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗体薬物コンジュゲートは、抗体薬物コンジュゲートの

抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数（ K_d 値）の点において、親和性が高い（ K_d 値が低い）ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約0.001～100mg/kgを1回あるいは1～180日間に1回の間隔で複数回投与すればよい。

[0280] 以下本発明を実施例にて説明するが本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0281] 以下の実施例において、室温は15℃乃至35℃を示す。脱水アセトニトリルは、関東化学から販売されているアセトニトリル（脱水）—Super—又は和光純薬工業から販売されているアセトニトリル（超脱水）を用いた。ピリジンは、関東化学から販売されているピリジン（脱水）—Super—を用いた。シリカゲルクロマトグラフィーは、Biotage SNAP Ultra（Biotage製）、Chromatorex Q-Pack SI（富士シリシア製）又はPurify-Pack-Ex SI（昭光サイエンス製）を用いて実施した。DIOLシリカゲルカラムクロマトグラフィーは、Chromatorex Q-pack DIOL（富士シリシア製）を用いて実施した。C18シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、Biotage SNAP Ultra C18（Biotage製）を用いて実施した。カラムクロマトグラフィーの溶出は薄層クロマトグラフィー（TLC）による観察下に行った。溶出溶媒に使用した0.1%トリエチルアミンとは、溶出溶媒総容量中に0.1%のトリエチルアミンを含有することを意味する。分取HPLCは、SHIMADZU SPD-M10A HPLCシステム（島津製作所）等を用いて実施した。分取カラムは、Kinetex（5 μ m, C18, 100Å, 250×30.0mm, Phenomenex製）又はKinetex（5 μ m, C18, 100Å, 250×

21. 2mm, Phenomenex製)を用いた。

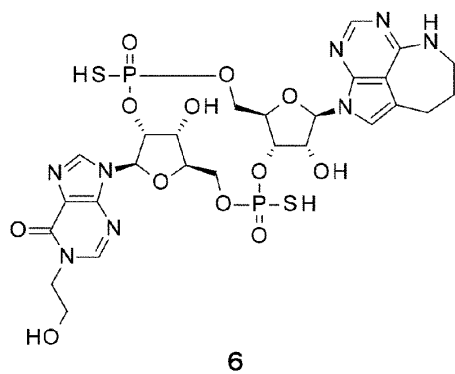
各種スペクトルデータの測定には以下の機器を用いた。¹H-NMRスペクトルは、JEOL ECS-400 (400MHz)、Varian 400-MR (400MHz) 又はVarian Unity Inova 500 (500MHz) を用いて測定した。³¹P-NMRスペクトルは、JEOL ECS-400 (160MHz) を用いて測定した。マスマスペクトルは、Agilent 6130 Quadrupole LC/MSシステム (Agilent Technologies) を用いて測定した。LC/MSの測定は、以下の条件で実施した [カラム: Develosil Comb i-RP, 5 μ m, 50 $\times$ 2.0mm (野村化学製), 移動相: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液/0.1%ギ酸水溶液、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液: 2%-100% (0分-5分又は0分-10分)]。

[0282] 実施例1: CDN6の合成

(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aS, 16R)-15, 16-ジヒドロキシー-7-[1-(2-ヒドロキシエチル)-6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]-2, 10-ビス(スルファニル)-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2 λ^5 , 10 λ^5 -フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ジオン

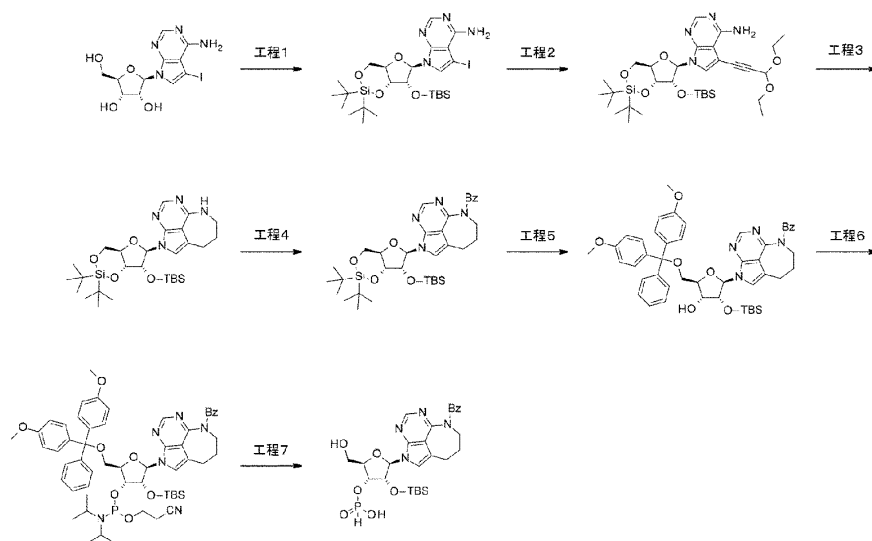
[0283]

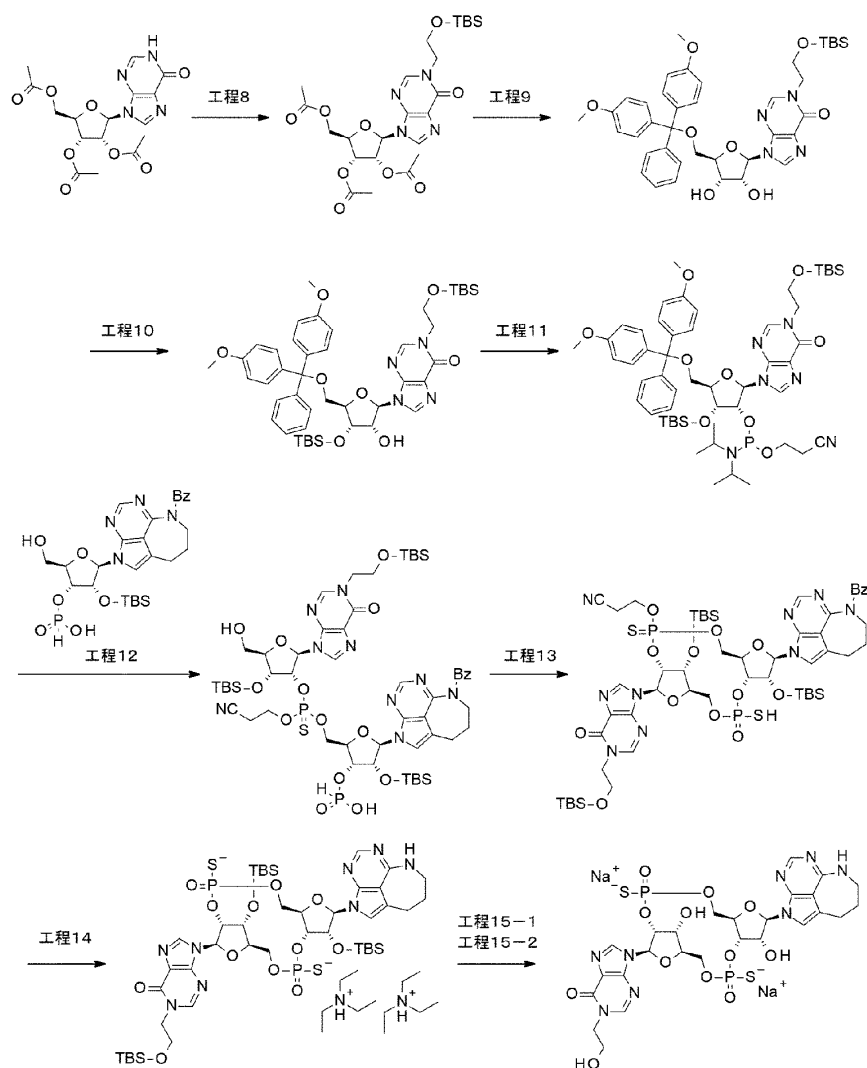
[化93]

**6a** (ジアステレオマー1)**6b** (ジアステレオマー2)

[0284] [合成スキーム]

[0285] [化94]





[0286] (工程 1)

7- {2-O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] -3, 5-O- (ジ-tert-ブチルシリリデン) -β-D-リボフラノシル} -5-ヨード-7H-ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-4-アミン

文献既知 (Tetrahedron 2007, 63, 9850-9861) の5-ヨードツベルシジン (1.0 g) のN, N-ジメチルホルミアミド (10 mL) 溶液に、0℃でジ-tert-ブチルシリルビス (トリフルオロメタンスルホナート) (1.24 mL) をゆっくり滴下した後、同温度

で30分間攪拌した。イミダゾール(868mg)を0℃で加えた後、室温まで昇温して30分間攪拌した。室温でtert-ブチルジメチルクロロシランを加え、同温度で終夜攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル]で精製し、標題化合物(910mg)を得た。

MS (ESI) m/z : 647 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.25 (1H, s), 7.03 (1H, s), 6.10 (1H, s), 5.63 (2H, brs), 4.49-4.44 (2H, m), 4.26 (1H, dd, J=9.7, 4.8 Hz), 4.17 (1H, m), 4.00 (1H, t, J=9.7 Hz), 1.09 (9H, s), 1.04 (9H, s), 0.91 (9H, s), 0.13 (3H, s), 0.11 (3H, s).

[0287] (工程2)

7-{2-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]-3,5-O-(ジ-tert-ブチルシリリデン)-β-D-リボフラノシル}-5-(3,3-ジエトキシプロパー1-イン-1-イル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン

上記工程1で得られた化合物(910mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(3.0mL)-テトラヒドロフラン(9.0mL)混合溶液にプロパルギルアルデヒドジメチルアセタール(1.01mL)、トリエチルアミン(0.392mL)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)(163mg)、及びヨウ化銅(I)(53.6mg)を順に加え、40℃で18時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルを加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル]で精製し、

標題化合物 (878 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 647 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.27 (1H, s), 7.17 (1H, s), 6.09 (1H, s), 5.56 (2H, brs), 5.50 (1H, s), 4.48 (1H, dd, J=9.1, 4.9 Hz), 4.42 (1H, d, J=4.9 Hz), 4.25 (1H, dd, J=9.4, 4.6 Hz), 4.17 (1H, m), 4.00 (1H, t, J=9.7 Hz), 3.85–3.77 (2H, m), 3.66 (2H, m), 1.28 (6H, t, J=7.3 Hz), 1.08 (9H, s), 1.04 (9H, s), 0.91 (9H, s), 0.13 (3H, s), 0.11 (3H, s).

[0288] (工程3)

2- {2-O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] -3, 5-O- (ジ-tert-ブチルシリリデン) - β -D-リボフラノシル} -6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレン

上記工程2で得られた化合物 (878 mg) のエタノール (8.8 mL) 溶液に10%パラジウム炭素 (M) wet (500 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で9時間攪拌した。触媒を濾去した後、ジクロロメタンで洗浄し、濾液を減圧濃縮した。残留物の酢酸 (8.8 mL) 溶液に10%パラジウム炭素 (M) wet (500 mg) を加え、水素雰囲気下、40℃で2日間攪拌した。触媒を濾去した後、ジクロロメタンで洗浄し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル/0.1%トリエチルアミン] で精製し、標題化合物 (603 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 561 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.47 (1H, brs), 8.07 (1H, s), 6.70 (1H, s), 6.14 (1H, s), 4.47–4.43 (2H, m), 4.29 (1H, dd, J=9.1, 4.8 Hz), 4.

1.5 (1H, m), 3.99 (1H, t, J=9.7 Hz), 3.55 (2H, m), 2.89 (2H, t, J=5.4 Hz), 2.04 (2H, m), 1.09 (9H, s), 1.04 (9H, s), 0.90 (9H, s), 0.10 (3H, s), 0.10 (3H, s).

[0289] (工程4)

6-ベンゾイル-2-{2-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]-3,5-O-(ジ-tert-ブチルシリリデン)-β-D-リボフラノシル}-6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン

[0290] 上記工程3で得られた化合物(2.17g)のジクロロメタン(21.7mL)溶液に室温で、ピリジン(1.56mL)、N,N-ジメチルアミノピリジン(94.5mg)、及び塩化ベンゾイル(0.898mL)を順に加え、50℃で15時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した。ジクロロメタンで抽出後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル/0.1%トリエチルアミン]で精製し、標題化合物(1.91g)を得た。

MS(ESI) m/z: 665 (M+H)⁺.

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 8.08 (1H, s), 7.37-7.33 (3H, m), 7.23 (2H, t, J=7.6 Hz), 6.97 (1H, s), 6.21 (1H, s), 4.50-4.46 (2H, m), 4.37-4.30 (2H, m), 4.28-4.09 (2H, m), 4.02 (1H, t, J=10.0 Hz), 3.03 (2H, t, J=6.3 Hz), 2.29-2.17 (2H, m), 1.10 (9H, s), 1.05 (9H, s), 0.90 (9H, s), 0.10 (6H, s).

[0291] (工程5)

6-ベンゾイル-2-{5-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-2-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]-β-D

ーリボフラノシル}ー6, 7, 8, 9ーテトラヒドロー2Hー2, 3, 5,
6ーテトラアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程4で得られた化合物 (1.91 g) のジクロロメタン (15 mL) 溶液に、0℃で調製したフッ化水素ーピリジン (0.30 mL) とピリジン (1.88 mL) の混合液を加え、0℃で2時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液をジクロロメタンで抽出した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をピリジン (15 mL) に溶解し、4, 4'ージメトキシトリチルクロリド (1.17 g) を加え、0℃で12時間攪拌した。メタノールを加え30分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液をジクロロメタンで抽出した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル/0.1% トリエチルアミン] で精製し、標題化合物 (1.98 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 827 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.07 (1H, s), 7.47 (2H, m), 7.37-7.19 (13H, m), 6.84 (4H, m), 6.37 (1H, d, J=5.5 Hz), 4.75 (1H, t, J=5.2 Hz), 4.38-4.20 (4H, m), 3.80 (6H, s), 3.53 (1H, dd, J=10.7, 2.8 Hz), 3.40 (1H, dd, J=11.0, 3.1 Hz), 2.83 (1H, d, J=3.7 Hz), 2.78 (2H, t, J=6.4 Hz), 2.17 (2H, m), 0.81 (9H, s), -0.03 (3H, s), -0.21 (3H, s).

[0292] (工程6)

6ーベンゾイルー2ー(5ーOー[ビス(4ーメトキシフェニル)(フェニル)メチル]ー2ーOー[tertーブチル(ジメチル)シリル]ー3ーOー{(2ーシアノエトキシ)[ジ(プロパンー2ーイル)アミノ]ホスファニル}ーβ-Dーリボフラノシル)ー6, 7, 8, 9ーテトラヒドロー2H

－2, 3, 5, 6－テトラアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程5で得られた化合物 (1.98 g) のジクロロメタン (23.9 mL) 溶液にN, N－ジイソプロピルエチルアミン (1.02 mL) と2－シアノエチルN, N－ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (1.07 mL) を加え、室温で15時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液をジクロロメタンで抽出後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン／酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (2.06 g) をリン原子上のジアステレオマー混合物 (ジアステレオマー比＝7 : 3) として得た。

MS (ESI) m/z : 1027 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.06 (0.3H, s), 8.04 (0.7H, s), 7.50–7.16 (15H, m), 6.85–6.79 (4H, m), 6.35 (0.7H, d, J=6.7 Hz), 6.31 (0.3H, d, J=6.1 Hz), 4.84 (0.7H, dd, J=7.0, 4.6 Hz), 4.78 (0.3H, t, J=5.8 Hz), 4.43–4.17 (4H, m), 4.04–3.85 (1.3H, m), 3.80–3.76 (6H, m), 3.69–3.43 (3H, m), 3.50 (0.7H, dd, J=10.6, 3.3 Hz), 3.33–3.26 (1H, m), 2.87–2.76 (2H, m), 2.74–2.60 (1.4H, m), 2.31 (0.6H, t, J=6.7 Hz), 2.23–2.11 (2H, m), 1.21–1.13 (7.8H, m), 1.04 (4.2H, d, J=6.7 Hz), 0.73 (2.7H, s), 0.72 (6.3H, s), –0.03 (0.9H, s), –0.06 (2.1H, s), –0.24 (3H, s).

[0293] (工程7)

6－ベンゾイル－2－{2－O－[tert－ブチル (ジメチル) シリル]
－3－O－[ヒドロキシ (オキソ) －λ⁵－ホスファニル]－β－D－リボフ

ラノシル} - 6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程6で得られた化合物 (935 mg) のアセトニトリル (4.55 mL) 溶液に水 (33 μ L) とトリフルオロ酢酸ピリジン塩 (229 mg) を加え、室温で15分間攪拌した。反応液にtert-ブチルアミン (4.55 mL) を加え、室温で15分間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残留物をアセトニトリル (5 mL) で2回共沸した。残留物のジクロロメタン (11.4 mL) 溶液に水 (0.164 mL) を加えた後、ジクロロ酢酸 (0.651 mL) のジクロロメタン (11.4 mL) 溶液を加え、室温で15分間攪拌した。ピリジン (1.25 mL) を加えて反応を停止した後、反応液を減圧濃縮した。残留物を脱水アセトニトリル (10 mL) で3回共沸し、最後の1回は5 mL 程度のアセトニトリルを残した。得られた標題化合物のアセトニトリル溶液をそのまま下記工程12で用いた。

[0294] (工程8)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)イノシン

市販 (Ark Pharm) の2', 3', 5'-トリ-O-アセチルイノシン (10.0 g) のテトラヒドロフラン (100 mL) 懸濁液に、2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エタン-1-オール (5.37 g) とトリフェニルホスフィン (7.69 g) を加えた後、ジプロパン-2-イル (E)-ジアゼン-1, 2-ジカルボキシレート (6.10 mL) を加え、室温で6時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル/ジクロロメタン] で精製し、標題化合物をトリフェニルホスフィンオキシドとの混合物 (10.6 g) として得た。

MS (ESI) m/z : 553 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.05 (1H, s), 7.92 (1H, s), 6.12 (1H, d, J=5.4 Hz), 5.86 (1H, t, J=5

. 4 Hz), 5.59 (1H, dd, $J=5.4, 4.2$ Hz), 4.47–4.41 (2H, m), 4.38–4.31 (1H, m), 4.22–4.17 (2H, m), 3.89 (2H, t, $J=4.8$ Hz), 2.15 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.08 (3H, s), 0.83 (9H, s), –0.06 (3H, s), –0.06 (3H, s).

[0295] (工程9)

5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)イノシン

上記工程8で得られた化合物(10.6g)のテトラヒドロフラン(30mL)-メタノール(30mL)混合溶液に炭酸カリウム(150mg)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に酢酸(125 μ L)を加えて減圧濃縮後、残留物をピリジンで共沸した。残留物のピリジン(60mL)溶液に、0℃で4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(6.50g)を加え、30分間攪拌後、冷蔵庫で終夜保管した。反応液にメタノール(2mL)を加え、30分間攪拌後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%トリエチルアミン]で精製し、標題化合物をトリフェニルホスフィンオキシドとの混合物(7.21g)として得た。

MS(ESI) m/z : 729 (M+H)⁺.

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.01 (1H, s), 7.97 (1H, s), 7.35–7.30 (2H, m), 7.25–7.17 (7H, m), 6.81–6.76 (4H, m), 5.95 (1H, d, $J=5.4$ Hz), 5.13 (1H, brs), 4.68–4.61 (1H, m), 4.43–4.36 (2H, m), 4.31–4.23 (1H, m), 4.15–4.08 (1H, m), 3.89 (2H, t, $J=4.5$ Hz), 3.77 (6H, s), 3.42 (1H, dd, $J=10.3, 3.6$ Hz), 3.34 (1H, dd, $J=10.3, 3.6$ Hz), 3.10 (1H, brs), 0.83 (9H, s), –0.06 (3H, s), –0.07 (3H, s).

).

[0296] (工程10)

5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-3'-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]-1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)イノシン

上記工程9で得られた化合物(7.21g)のジクロロメタン(36mL)溶液にイミダゾール(1.41g)とtert-ブチル(クロロ)ジメチルシラン(1.49g)を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル/0.1%トリエチルアミン]で精製し、標題化合物(2.17g)と標題化合物の位置異性体である5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-2'-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]-1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)イノシン(2.55g)を得た。

MS(ESI) m/z: 843 (M+H)⁺.

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 7.99(1H, s), 7.97(1H, s), 7.43-7.39(2H, m), 7.33-7.19(7H, m), 6.83-6.77(4H, m), 5.96(1H, d, J=4.2Hz), 4.56-4.50(2H, m), 4.33-4.25(1H, m), 4.19-4.02(2H, m), 3.89(2H, t, J=4.8Hz), 3.78(6H, s), 3.45(1H, dd, J=10.9, 4.2Hz), 3.27(1H, dd, J=10.9, 4.2Hz), 3.03(1H, d, J=6.0Hz), 0.88(9H, s), 0.82(9H, s), 0.07(3H, s), -0.01(3H, s), -0.07(3H, s), -0.07(3H, s).

位置異性体(2'-O-TBS体)

MS (ESI) m/z : 843 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.98 (1H, s), 7.94 (1H, s), 7.46–7.42 (2H, m), 7.35–7.20 (7H, m), 6.85–6.79 (4H, m), 5.99 (1H, d, J=5.4 Hz), 4.83 (1H, t, J=5.1 Hz), 4.33–4.29 (1H, m), 4.27–4.24 (1H, m), 4.24–4.12 (2H, m), 3.90 (2H, t, J=4.5 Hz), 3.79 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.48 (1H, dd, J=10.3, 3.0 Hz), 3.40 (1H, dd, J=10.3, 3.0 Hz), 2.71 (1H, d, J=3.6 Hz), 0.86 (9H, s), 0.83 (9H, s), 0.01 (3H, s), -0.07 (3H, s), -0.07 (3H, s), -0.11 (3H, s).

[0297] (工程11)

5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-3'-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]-1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)-2'-O-{(2-シアノエトキシ)[ジ(プロパン-2-イル)アミノ]ホスファニル}イノシン

上記工程10で得られた化合物(2.17g)のジクロロメタン(25.7mL)溶液に、4,5-ジシアノイミダゾール(334mg)と2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト(0.980mL)を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液をジクロロメタンで抽出後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をD10Lシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル]で精製し、標題化合物(2.65g)をリン原子上のジアステレオマー混合物として得た。

MS (ESI) m/z : 1043 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.03 (0.53H, s), 8.01 (0

. 47 H, s), 7.97 (0.53 H, s), 7.93 (0.47 H, s), 7.45–7.41 (2 H, m), 7.35–7.19 (7 H, m), 6.83–6.78 (4 H, m), 6.17 (0.53 H, d, J=4.2 Hz), 6.05 (0.47 H, d, J=4.2 Hz), 4.87–4.80 (0.47 H, m), 4.64–4.58 (0.53 H, m), 4.46–4.40 (1 H, m), 4.30–4.05 (3 H, m), 3.92–3.87 (2 H, m), 3.78 (6 H, s), 3.86–3.40 (5 H, m), 3.33–3.24 (1 H, m), 2.54 (0.94 H, t, J=6.0 Hz), 2.43 (1.06 H, t, J=6.7 Hz), 1.16–1.09 (9 H, m), 1.01–0.97 (3 H, m), 0.83 (4.23 H, s), 0.83 (4.77 H, s), 0.82 (9 H, s), 0.07 (1.41 H, s), 0.04 (1.59 H, s), –0.02 (3 H, s), –0.07 (1.41 H, s), –0.08 (1.59 H, s), –0.08 (3 H, s).

[0298] (工程12)

上記工程11で得られた化合物(950 mg)を脱水アセトニトリル(5 mL)で3回共沸し、最後の1回は3 mL程度のアセトニトリルを残し、モレキュラーシーブス3A, 1/16(ペレット状のもの5粒)を加えた。このアセトニトリル溶液を上記工程7で調製したアセトニトリル溶液に加え、窒素雰囲気下、室温で20分間攪拌した。反応液にN, N-ジメチル-N'-(3-スルファニリデン-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-5-イル)メタンイミドアミド(206 mg)を加え、室温で30分間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。残留物のジクロロメタン(13.0 mL)溶液に水(0.164 mL)を加えた後、ジクロロ酢酸(0.822 mL)のジクロロメタン(13.0 mL)溶液を加え、室温で15分間攪拌した。反応液にピリジン(9.01 mL)を加えて反応を停止した後、減圧濃縮した。得られた粗生成物をそのまま次の反応に用いた。

[0299] (工程13)

3-({(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-14-(6-ベンゾイル-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-イル)-15, 16-ビス{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7-[1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)-6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]-2-オキソ-2-スルファニル-10-スルファニリデンオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-10-イル}オキシ)プロパンニトリル

- [0300] 上記工程12で得られた粗生成物のピリジン(27.1 mL)溶液を20 mL程度まで濃縮した後、2-クロロ-5, 5-ジメチル-1, 3, 2λ⁵-ジオキサホスフィナン-2-オン(622 mg)を加え、室温で30分間攪拌した。反応液に水(0.57 mL)と3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン(230 mg)を加え、室温で15分間攪拌した。反応液を炭酸水素ナトリウム(3.60 g)の水溶液(130 mL)に注ぎ、室温で30分間攪拌した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、乾燥剤を濾去し濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル/メタノール]で精製し、標題化合物(494 mg)をリン原子上のジアステレオマー混合物として得た。
MS(ESI) m/z: 1274 (M+H)⁺.

- [0301] (工程14)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-15, 16-ビス{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7-[1-(2-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}エチル)-6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]-2, 10-ジオキソ-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]

アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノー-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス(チオラート)

上記工程13で得られた化合物(494mg)のメタノール(5mL)溶液に28%アンモニア水(5mL)を加え、室温で15時間攪拌した。反応液を濃縮後、残留物をC18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル]で精製し、標題化合物のジアステレオマー1(88.5mg:不純物含有)とジアステレオマー2(70.7mg:不純物含有)を得た。

ジアステレオマー1(低極性)

MS(ESI) m/z: 1003 (M-C₆H₁₅Si+2H)⁺.

ジアステレオマー2(高極性)

MS(ESI) m/z: 1003 (M-C₆H₁₅Si+2H)⁺.

[0302] (工程15-1)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aS, 16R)-15, 16-ジヒドロキシ-7-[1-(2-ヒドロキシエチル)-6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]-2, 10-ジオキソ-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[cd]アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノー-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス(チオラート)

(ジアステレオマー1)

[0303] 上記工程14で得られた化合物(ジアステレオマー1)(88.5mg:不純物含有)にトリエチルアミン三フッ化水素酸塩(2.0mL)を加え、45℃で3時間攪拌した。室温下、反応液に氷冷した1M炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液(10mL)とトリエチルアミン(2mL)の混合液

を加えた。反応液を減圧濃縮後、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] と分取 HPLC [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル、アセトニトリル: 5%–30% (0分–40分)] で精製した。得られた化合物 (トリエチルアミン塩) を以下の手法でナトリウム塩に変換した。

[0304] [ナトリウム塩への変換]

BT AG (登録商標) 50W-X2 Resin (biotechnology grade, 100–200 mesh, hydrogen form) (500 mg) を純水に懸濁し、空のカラムに充填した。過剰の純水を自然流下させた後、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (5 mL) と純水 (10 mL) を順に自然流下させた。上記で得られた化合物を純水 (5 mL) に溶解してカラムにチャージした。自然流下した溶液を分取後、更に純水 (10 mL) で溶出した。目的物を含む画分を併せて凍結乾燥し、標題化合物 (25.7 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 775 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.63 (1H, s), 8.22 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.11 (1H, s), 6.30–6.24 (2H, m), 5.46–5.37 (1H, m), 5.23–5.15 (1H, m), 4.83–4.79 (1H, m), 4.78–4.74 (1H, m), 4.53–4.42 (2H, m), 4.35–4.16 (3H, m), 4.16–3.97 (3H, m), 3.83–3.78 (2H, m), 3.52–3.47 (2H, m), 2.88–2.81 (2H, m), 2.03–1.95 (2H, m).

³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 57.8 (s), 54.4 (s).

[0305] (工程15–2)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aS, 16R)–15, 16–ジヒドロキシ–7–[1–(2–ヒドロキシエチル)–6–オキソ–1, 6–ジヒドロ–9H–プリン–9–イル]–2, 1

0-ジオキソ-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[cd]アズレン-2-イル)オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテラデシン-2, 10-ビス(チオラート)
(ジアステレオマー2)

[0306] 上記工程14で得られた化合物(ジアステレオマー2)(70.7mg:不純物含有)を用いて、上記工程15-1と同様の手法で反応を行った後、以下の[精製条件]で精製を行い、標題化合物をトリエチルアミン塩として得た。

[精製条件] C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル]、分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル、アセトニトリル:5%-25%(0分-40分)]、及び分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/メタノール、メタノール:15%-70%(0分-40分)]。

[0307] 得られたトリエチルアミン塩を上記工程15-1に記載の[ナトリウム塩への変換]と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物(17.8mg)を得た。

MS(ESI) m/z: 775 (M+H)⁺.

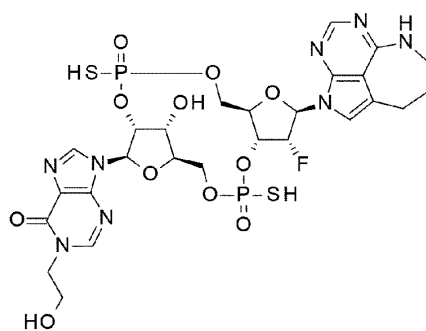
¹H-NMR(CD₃OD) δ: 8.72(1H, s), 8.23(1H, s), 8.02(1H, s), 7.11(1H, s), 6.30(2H, dd, J=13.6, 7.6 Hz), 5.48-5.39(2H, m), 4.78(1H, dd, J=6.7, 4.2 Hz), 4.51-4.28(5H, m), 4.26-4.13(2H, m), 4.06-4.00(1H, m), 3.93-3.86(1H, m), 3.85-3.80(2H, m), 3.52-3.47(2H, m), 2.94-2.88(2H, m), 2.05-1.97(2H, m)。

^{31}P -NMR (CD_3OD) δ : 62.9 (s), 60.0 (s).

[0308] 実施例2: CDN34の合成

(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) - 15-フルオロ-16-ヒドロキシ-7-[1-(2-ヒドロキシエチル)-6-オキソ-1,6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]-2,10-ビス(スルファニル)-14-(6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-イル)オクタヒドロ-2H,10H,12H-5,8-メタノ-2 λ^5 ,10 λ^5 -フロ[3,2- ι][1,3,6,9,11,2,10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2,10-ジオン

[0309] [化95]



34

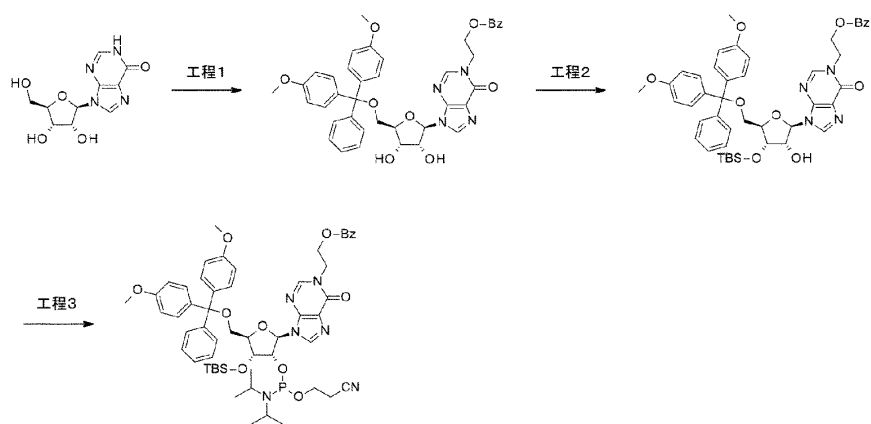
34a (ジアステレオマー1)

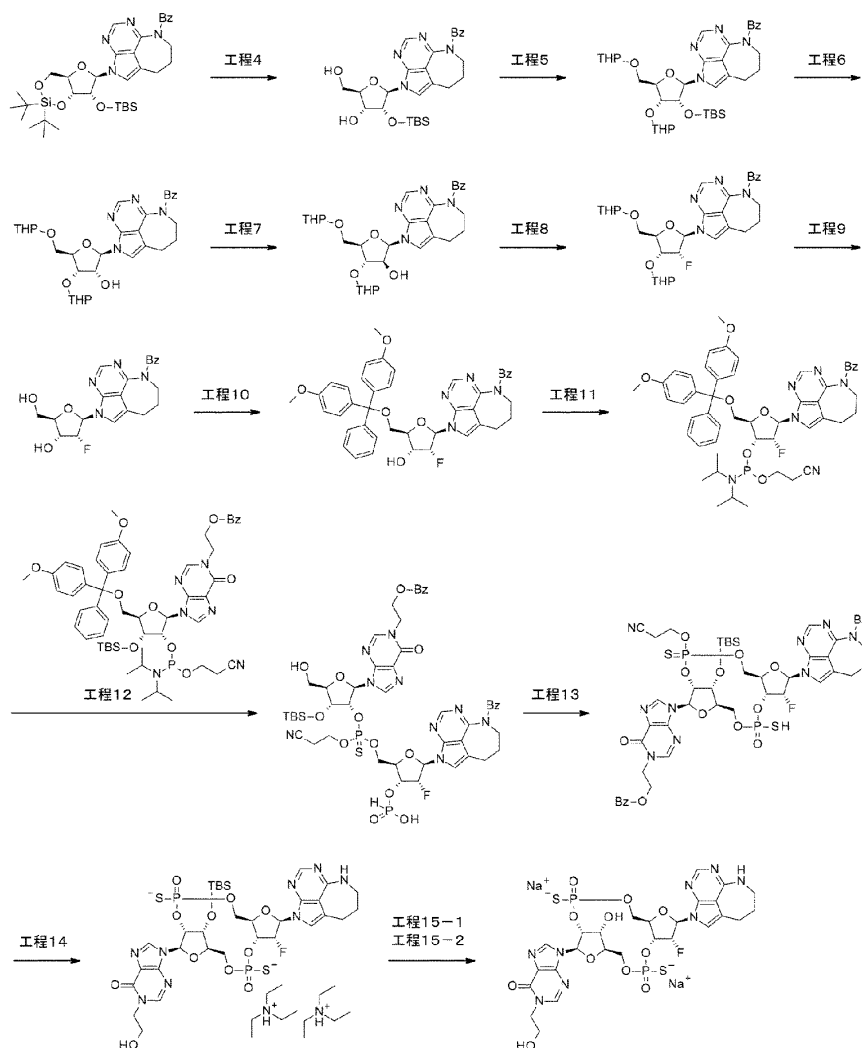
34b (ジアステレオマー2)

[0310] [合成スキーム]

[0311]

[化96]





[0312] (工程1)

1-〔2-(ベンゾイルオキシ)エチル〕-5'-O-〔ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル〕イノシン

市販(東京化成工業)のイノシン(10.0g)のピリジン(50mL)とN,N-ジメチルアセトアミド(50mL)溶液に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(15.2g)を0℃で加えた後、4℃で64時間攪拌した。反応液にメタノール(2mL)を加え、10分攪拌後に50mL程度まで濃縮した。残留物に2-ブロモエチルベンゾエート(7.02mL)と

2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10-オクタヒドロピリミド [1, 2-a] アゼピン (13.9 mL) を加え、室温で1日攪拌した。反応液に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン／酢酸エチル／メタノール／0.1% トリエチルアミン] で精製し、標題化合物 (15.2 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 719 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.00 (1H, s), 7.98 (1H, s), 7.98–7.94 (2H, m), 7.62–7.15 (12H, m), 6.80–6.75 (4H, m), 5.95 (1H, d, J=5.4 Hz), 4.82–4.79 (1H, m), 4.72–4.64 (3H, m), 4.55–4.34 (5H, m), 3.77 (6H, s), 3.43 (1H, dd, J=10.6, 3.9 Hz), 3.34 (1H, dd, J=10.6, 3.6 Hz).

[0313] (工程2)

1-[2-(ベンゾイルオキシ)エチル]-5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-3'-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]イノシン

上記工程1で得られた化合物 (3.01 g) を用いて、実施例1工程10と同様の手法で合成を行い、標題化合物 (1.20 g) と標題化合物の位置異性体である 1-[2-(ベンゾイルオキシ)エチル]-5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-2'-O-[tert-ブチル(ジメチル)シリル]イノシン (1.22 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 833 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.03 (1H, s), 7.98–7.96 (1H, m), 7.96 (1H, s), 7.96–7.94 (1H, m), 7.59–7.52 (1H, m), 7.44–7.38 (4H, m), 7.

3.2–7.15 (7H, m), 6.83–6.77 (4H, m), 5.94 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 4.69–4.63 (2H, m), 4.59–4.35 (4H, m), 4.16 (1H, dd, $J=3.8, 1.9$ Hz), 3.77 (6H, d, $J=1.8$ Hz), 3.47 (1H, dd, $J=10.9, 3.0$ Hz), 3.27 (1H, dd, $J=10.9, 4.2$ Hz), 3.00 (1H, d, $J=6.7$ Hz), 0.87 (9H, s), 0.06 (3H, s), –0.01 (3H, s).

(2' –O–TBS体)

MS (ESI) m/z : 833 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.01 (1H, s), 7.97–7.93 (2H, m), 7.91 (1H, s), 7.59–7.53 (1H, m), 7.45–7.38 (4H, m), 7.35–7.17 (7H, m), 6.83–6.77 (4H, m), 5.97 (1H, d, $J=6.0$ Hz), 4.84 (1H, t, $J=5.4$ Hz), 4.71–4.60 (2H, m), 4.52–4.37 (2H, m), 4.33–4.28 (1H, m), 4.28–4.24 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.47 (1H, dd, $J=10.9, 3.0$ Hz), 3.38 (1H, dd, $J=10.9, 3.6$ Hz), 2.71 (1H, d, $J=3.0$ Hz), 0.80 (9H, s), –0.03 (3H, s), –0.19 (3H, s).

[0314] (工程3)

1 – [2 – (ベンゾイルオキシ) エチル] – 5' –O– [ビス(4–メトキシフェニル) (フェニル) メチル] – 3' –O– [tert–ブチル (ジメチル) シリル] – 2' –O– { (2–シアノエトキシ) [ジ (プロパン–2–イル) アミノ] ホスファニル} イノシン

[0315] 上記工程2で得られた化合物 (1.20 g) を用いて、実施例1工程11と同様の手法で合成を行い、標題化合物 (1.41 g) をリン原子上のジアステレオマー混合物 (ジアステレオマー比=0.55:0.45) として得

た。

MS (ESI) m/z : 1033 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.05 (0.45H, s), 8.04 (0.55H, s), 7.99–7.95 (2H, m), 7.95 (0.55H, s), 7.92 (0.45H, s), 7.59–7.53 (1H, m), 7.45–7.39 (4H, m), 7.35–7.10 (7H, m), 6.83–6.78 (4H, m), 6.15 (0.55H, d, J=5.4Hz), 6.08 (0.45H, d, J=6.0Hz), 4.86–4.49 (3H, m), 4.49–4.35 (3H, m), 4.25–4.10 (1H, m), 3.78 (6H, s), 3.72–3.41 (5H, m), 3.35–3.25 (1H, m), 2.47 (1H, t, J=6.7Hz), 2.32 (1H, t, J=6.3Hz), 1.33–1.24 (6H, m), 1.13–1.03 (6H, m), 0.84 (4.05H, s), 0.84 (4.95H, s), 0.08 (1.35H, s), 0.05 (1.65H, s), 0.00 (1.35H, s), -0.01 (1.65H, s).

[0316] (工程4)

6-ベンゾイル-2- {2-O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] - β -D-リボフラノシル} -6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレン

実施例1工程4で得られた化合物 (35.80g) のジクロロメタン (322mL) -ピリジン (35mL) 混合溶液に、氷冷下でフッ化水素-ピリジン (6.33g) のジクロロメタン (36mL) 溶液を5分間かけて加え、同温度で3時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (268mL) と飽和食塩水 (143mL) を順に加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物にヘキサン/酢酸エチル (1:1) (108mL) を加えてスラリー状にした後、50℃で30分間攪拌し、ヘキサン (161mL) を追加して更に2時間攪拌した。析出した固体を濾取し、ヘキサン

／酢酸エチル（４：１）（１４３ｍＬ）で洗浄し、標題化合物（２６．８１ｇ）を得た。

MS (ESI) m/z : 525 (M+H)⁺.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7.98 (1H, s), 7.65 (1H, s), 7.39 (1H, m), 7.26–7.20 (4H, m), 6.19 (1H, d, $J=6.5$ Hz), 5.15 (1H, t, $J=5.6$ Hz), 5.00 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 4.48 (1H, t, $J=5.6$ Hz), 4.27 (1H, m), 4.11–4.02 (2H, m), 3.97 (1H, m), 3.67–3.57 (2H, m), 2.99 (2H, m), 2.23–2.07 (2H, m), 0.68 (9H, s), –0.11 (3H, s), –0.26 (3H, s).

[0317] (工程５)

６－ベンゾイル－２－{２－Ｏ－[*tert*－ブチル（ジメチル）シリル]－３，５－ビス－Ｏ－（オキサ－２－イル）－ β －Ｄ－リボフラノシル}－６，７，８，９－テトラヒドロ－２Ｈ－２，３，５，６－テトラアザベンゾ[*cd*]アズレン

上記工程４で得られた化合物（１９．９３ｇ）と３，４－ジヒドロ－２Ｈ－ピラン（３５ｍＬ）の N,N －ジメチルホルミアミド（２００ｍＬ）溶液に、氷冷下でｐ－トルエンスルホン酸－水和物（７．２５ｇ）を加え、室温で３時間攪拌した。氷冷下で反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン／酢酸エチル]で精製し、標題化合物（２４．７３ｇ）を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.10–8.07 (1H, m), 7.59–7.35 (1H, m), 7.35–7.27 (3H, m), 7.25–7.17 (2H, m), 6.44–6.36 (1H, m), 4.90–3.36 (13H, m), 3.06–2.96 (2H, m), 2.31–2.15

(2 H, m), 2.01–1.43 (12 H, m), 0.84–0.73 (9 H, m), 0.04–(–0.35) (6 H, m).

[0318] (工程6)

6-ベンゾイル-2-[3,5-ビス-O-(オキサン-2-イル)-β-D-リボフラノシル]-6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン

[0319] 上記工程5で得られた化合物(24.73 g)と酢酸(3.1 mL)のテトラヒドロフラン(250 mL)溶液に、氷冷下でフッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液(約1 M, 55 mL)を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチルを加え、水と飽和食塩水で順に洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル]で精製し、標題化合物(18.74 g)を得た。
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.12–8.09 (1 H, m), 7.49–7.30 (4 H, m), 7.28–7.20 (2 H, m), 6.41–6.30 (1 H, m), 4.83–4.18 (7 H, m), 4.12–3.50 (7 H, m), 3.06–2.97 (2 H, m), 2.31–2.17 (2 H, m), 1.96–1.47 (12 H, m).

[0320] (工程7)

6-ベンゾイル-2-[3,5-ビス-O-(オキサン-2-イル)-β-D-アラビノフラノシル]-6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン

[0321] 上記工程6で得られた化合物(18.74 g)とピリジン(13.1 mL)のジクロロメタン(300 mL)溶液に、氷冷下でトリフルオロメタンスルホン酸無水物(11 mL)を滴下し10分間攪拌した。反応液に飽和食塩水を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をテトラヒドロフラン(300 mL)に溶解し、氷冷下で亜硝酸テトラブチルアンモ

ニウム (28.34 g) のテトラヒドロフラン (150 mL) 溶液を滴下し、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチルを加え、水と飽和食塩水で順に洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (10.46 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.13–8.06 (1H, m), 7.63–7.30 (4H, m), 7.29–7.18 (2H, m), 6.79–6.55 (1H, m), 4.93–3.45 (14H, m), 3.11–2.95 (2H, m), 2.32–2.14 (2H, m), 1.98–1.44 (12H, m).

[0322] (工程8)

6-ベンゾイル-2-[2-デオキシ-2-フルオロ-3,5-ビス-O-(オキサン-2-イル)- β -D-リボフラノシル]-6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ [c,d] アズレン

[0323] 上記工程7で得られた化合物 (10.46 g) とピリジン (7.3 mL) のジクロロメタン (200 mL) 溶液に、氷冷下でトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (6.1 mL) を滴下し10分間攪拌した。反応液に飽和食塩水を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をテトラヒドロフラン (200 mL) に溶解し、氷冷下でフッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液 (約1M, 150 mL) を加え、同温度で3時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (7.65 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.13–8.08 (1H, m), 7.53

−7.31 (4H, m), 7.26−7.22 (2H, m), 6.68−6.53 (1H, m), 5.42−5.08 (1H, m), 4.93−4.18 (6H, m), 4.10−3.76 (3H, m), 3.71−3.47 (3H, m), 3.06−2.96 (2H, m), 2.29−2.18 (2H, m), 1.96−1.47 (12H, m).

[0324] (工程9)

6-ベンゾイル-2-(2-デオキシ-2-フルオロ-β-D-リボフラノシル)-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程8で得られた化合物 (7.65 g) のエタノール (150 mL) 溶液に、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (6.62 g) を加え、50 °Cで3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残留物に酢酸エチルを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で順に洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (3.55 g) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.05 (1H, s), 7.41−7.35 (3H, m), 7.30−7.24 (2H, m), 7.06 (1H, s), 6.07−6.00 (2H, m), 5.85 (1H, ddd, J=52.8, 6.7, 4.7 Hz), 4.66 (1H, d, J=3.9 Hz), 4.42−4.31 (2H, m), 4.20 (1H, m), 3.93 (1H, dd, J=12.9, 1.6 Hz), 3.74 (1H, td, J=12.3, 1.6 Hz), 3.12−2.96 (2H, m), 2.51 (1H, s), 2.33−2.15 (2H, m).

[0325] (工程10)

6-ベンゾイル-2-{5-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-2-デオキシ-2-フルオロ-β-D-リボフラノシル}-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ

[c d] アズレン

上記工程 9 で得られた化合物 (3.55 g) の脱水ピリジン (50 mL) 溶液に 4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド (4.43 g) を加え、窒素雰囲気下、室温で 2 時間攪拌した。反応液にメタノール (1 mL) を加えて 10 分間程度攪拌後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル/0.1% トリエチルアミン] で精製し、標題化合物 (5.77 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.09 (1H, s), 7.45–7.41 (2H, m), 7.36–7.17 (13H, m), 6.85–6.79 (4H, m), 6.53 (1H, dd, $J=17.2, 2.3$ Hz), 5.40 (1H, ddd, $J=53.2, 4.8, 2.3$ Hz), 4.83–4.72 (1H, m), 4.32–4.21 (2H, m), 4.19–4.14 (1H, m), 3.79 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.59 (1H, dd, $J=11.0, 2.7$ Hz), 3.45 (1H, dd, $J=11.0, 3.5$ Hz), 2.79 (2H, t, $J=6.3$ Hz), 2.45 (1H, s), 2.24–2.11 (2H, m).

[0326] (工程 11)

6-ベンゾイル-2-(5-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-3-O-{(2-シアノエトキシ)[ジ(プロパン-2-イル)アミノ]ホスファニル}-2-デオキシー-2-フルオロ- β -D-リボフラノシル)-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程 10 で得られた化合物 (5.77 g) を用いて、実施例 1 工程 6 と同様の手法で反応を行い、標題化合物 (5.95 g) をリン原子上のジアステレオマー混合物 (ジアステレオマー比=1:1) として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.10 (0.5H, s), 8.09 (0.5H, s), 7.45–7.12 (15H, m), 6.84–6.75 (4H, m), 6.57–6.46 (1H, m), 5.61–5.33 (1H,

m), 5.07–4.83 (1H, m), 4.34–4.18 (3H, m), 3.93–3.72 (7H, m), 3.69–3.49 (4H, m), 3.38–3.27 (1H, m), 2.87–2.68 (2H, m), 2.61 (1H, td, J=6.3, 1.6 Hz), 2.40 (1H, td, J=6.4, 2.1 Hz), 2.21–2.12 (2H, m), 1.21–1.13 (9H, m), 1.03 (3H, d, J=6.7 Hz).

[0327] (工程12)

上記工程11で得られた化合物(1.02g)を用いて、実施例1工程7と同様の手法で反応を行い、6-ベンゾイル-2-{2-デオキシ-2-フルオロ-3-O-[ヒドロキシ(オキソ)- λ^5 -ホスファニル]- β -D-リボフラノシル}-6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレンのアセトニトリル溶液を得た。得られたアセトニトリル溶液と上記工程3で得られた化合物(1.15g)を用いて、実施例1工程12と同様の手法で反応を行い、得られた粗生成物をそのまま次の反応に用いた。

[0328] (工程13)

2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -14-(6-ベンゾイル-6,7,8,9-テトラヒドロ-2H-2,3,5,6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-イル)-16-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-10-(2-シアノエトキシ)-15-フルオロ-2-オキソ-2-スルファニル-10-スルファニリデンオクタヒドロ-2H,10H,12H-5,8-メタノ-2 λ^5 ,10 λ^5 -フロ[3,2-l][1,3,6,9,11,2,10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル]-6-オキソ-6,9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル}エチルベンゾエート

上記工程12で得られた粗生成物を用いて、実施例1工程13と同様の手法で反応を行い、標題化合物(818mg:不純物含有)をリン原子上のジアステレオマー混合物として得た。

MS (ESI) m/z : 1152 (M+H)⁺.

[0329] (工程14)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) - 16 - { [tert-ブチル(ジメチル)シリル] オキシ} - 15 - フルオロ - 7 - [1 - (2-ヒドロキシエチル) - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9H - プリン - 9 - イル] - 2, 10 - ジオキソ - 14 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [cd] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2H, 10H, 12H - 5, 8 - メタノ - 2λ⁵, 10λ⁵ - フロ [3, 2 - I] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2, 10 - ビス (チオラート)

上記工程13で得られた化合物(818mg)を用いて、実施例1工程14と同様の手法を用いて反応を行い、標題化合物のジアステレオマー1(107mg:不純物含有)とジアステレオマー2(101mg:不純物含有)を得た。

ジアステレオマー1 (低極性)

MS (ESI) m/z : 891 (M+H)⁺.

ジアステレオマー2 (高極性)

MS (ESI) m/z : 891 (M+H)⁺.

[0330] (工程15-1)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) - 15 - フルオロ - 16 - ヒドロキシ - 7 - [1 - (2-ヒドロキシエチル) - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9H - プリン - 9 - イル] - 2, 10 - ジオキソ - 14 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [cd] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2H, 10H, 12H - 5, 8 - メタノ - 2λ⁵, 10λ⁵ - フロ [3, 2 - I] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2, 10 - ビス (チオラート)

(ジアステレオマー 1)

[0331] 上記工程 14 で得られた化合物 (ジアステレオマー 1) (107 mg : 不純物含有) を用いて、実施例 1 工程 15-1 と同様の手法で反応を行った後、以下の [精製条件] で精製し、標題化合物をトリエチルアミン塩として得た。

[精製条件] C18 シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液 / アセトニトリル] 及び分取 HPLC [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液 / アセトニトリル, アセトニトリル : 5% - 30% (0 分 - 30 分)] .

得られたトリエチルアミン塩を、実施例 1 工程 15-1 に記載の [ナトリウム塩への変換] と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物 (29.1 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 777 ($M+H$)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.58 (1H, m), 8.11 (1H, m), 8.03 (1H, s), 7.11 (1H, s), 6.47 (1H, d, $J=17.5$ Hz), 6.26 (1H, d, $J=8.5$ Hz), 5.53-5.36 (2H, m), 5.29-5.17 (1H, m), 4.77 (1H, d, $J=4.2$ Hz), 4.54-4.46 (1H, m), 4.44-4.38 (1H, m), 4.35-4.32 (1H, m), 4.30-4.25 (2H, m), 4.25-4.16 (1H, m), 4.06-3.99 (1H, m), 3.96-3.85 (1H, m), 3.82-3.71 (2H, m), 3.54-3.42 (2H, m), 2.77-2.68 (1H, m), 2.66-2.55 (1H, m), 2.02-1.81 (2H, m).

³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 57.5 (s), 53.0 (s).

[0332] (工程 15-2)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -15-フルオロ-16-ヒドロキシ-7-[1-(2-ヒドロキシエチル)-6-オキソ-1,6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]

ー2, 10-ジオキソ-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート)
(ジアステレオマー2)

[0333] 上記工程14で得られた化合物(ジアステレオマー2)(101mg:不純物含有)を用いて、実施例1工程15-1と同様の手法で反応を行った後、以下の[精製条件]で精製し、標題化合物をトリエチルアミン塩として得た。

[精製条件] C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] 及び分取HPLC [10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 5%-20% (0分-30分)] .

得られたトリエチルアミン塩を、実施例1工程15-1に記載の[ナトリウム塩への変換]と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物(11.2mg)を得た。

MS (ESI) m/z : 777 (M+H)⁺.

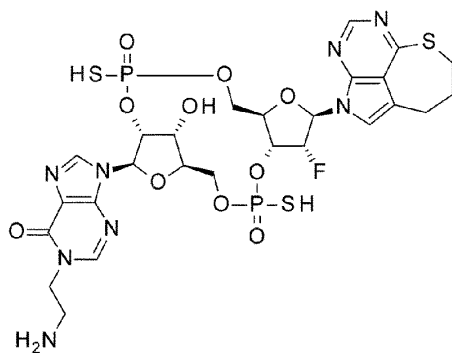
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.61 (1H, m), 8.16 (1H, m), 8.02 (1H, m), 7.36 (1H, s), 6.49 (1H, dd, J=16.0, 2.1 Hz), 6.28 (1H, d, J=8.5 Hz), 5.56-5.33 (3H, m), 4.58-4.49 (2H, m), 4.45-4.37 (2H, m), 4.31-4.27 (1H, m), 4.25-4.16 (1H, m), 4.10-3.98 (3H, m), 3.80 (2H, t, J=5.1 Hz), 3.48 (2H, dd, J=6.7, 3.6 Hz), 2.90-2.72 (2H, m), 2.00-1.90 (2H, m).

³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 59.5 (s), 57.7 (s).

[0334] 実施例3 : CDN49の合成

(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) - 7 -
 - [1 - (2 - アミノエチル) - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9H - プ
 リン - 9 - イル] - 14 - (8, 9 - ジヒドロ - 6 - チア - 2, 3, 5 - ト
 リアザベンゾ [c d] アズレン - 2 (7H) - イル) - 15 - フルオロ - 1
 6 - ヒドロキシ - 2, 10 - ビス (スルファニル) オクタヒドロ - 2H, 1
 0H, 12H - 5, 8 - メタノ - 2λ⁵, 10λ⁵ - フロ [3, 2 - l] [1
 , 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシ
 ン - 2, 10 - ジオン

[0335] [化97]



49

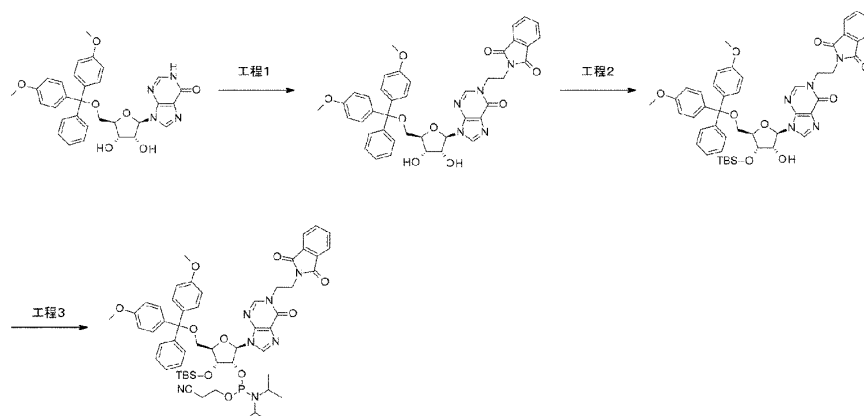
49a (ジアステレオマー1)

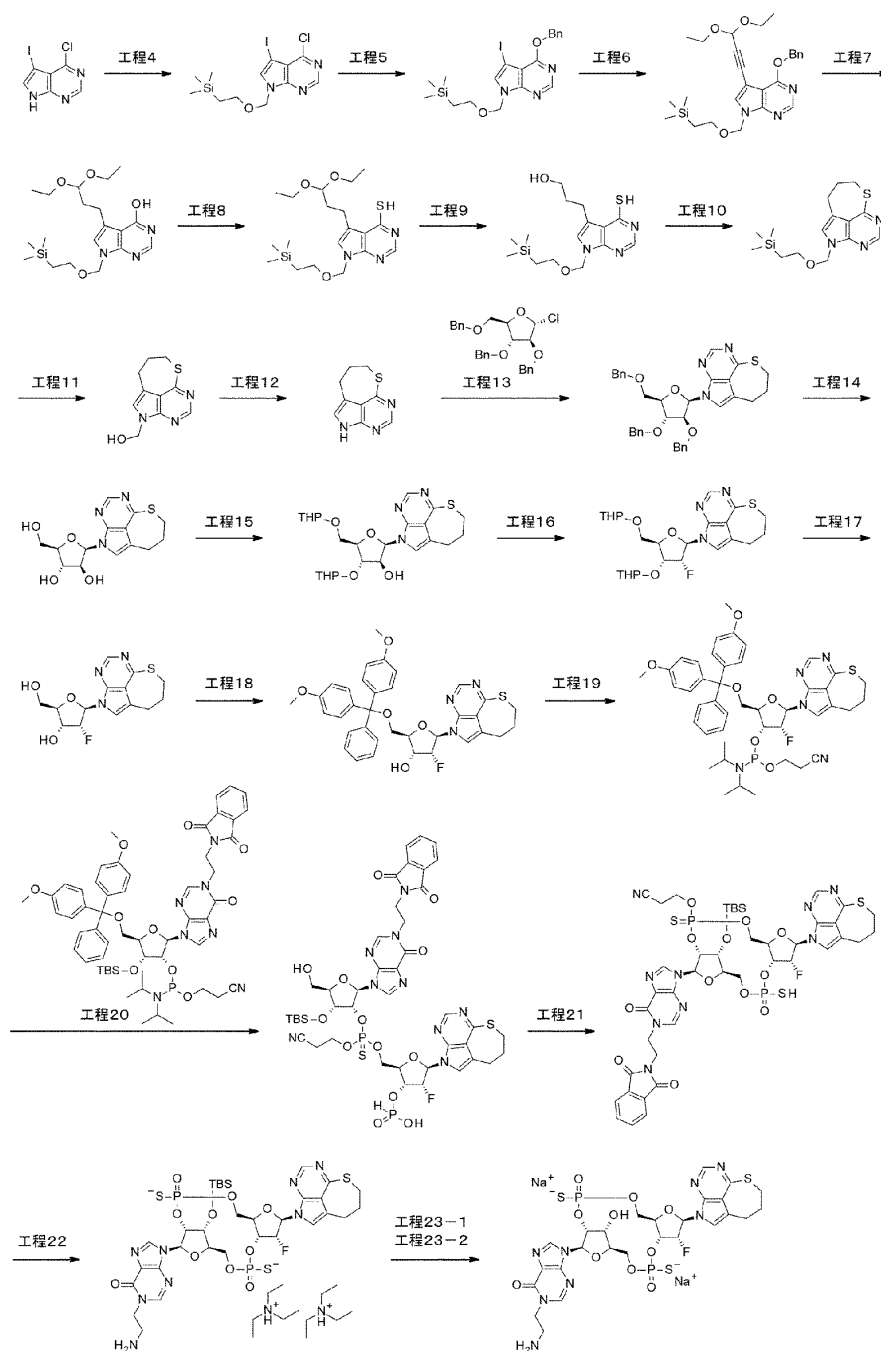
49b (ジアステレオマー2)

[0336] [合成スキーム]

[0337]

[化98]





[0338] (工程1)

5'-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-1-[2-(1,3-ジオキソ-1,3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル)エチル]イノシン

市販 (A a m d i s C h e m i c a l) の 5' - O - [ビス (4 - メトキシフェニル) (フェニル) メチル] イノシン (13.0 g) の N, N - ジメチルアセトアミド (60 mL) 懸濁液に、N - (2 - ブロモエチル) フタルイミド (7.02 g) と 1, 8 - ジアザビシクロ [5. 4. 0] - 7 - ウンデセン (4.1 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。N - (2 - ブロモエチル) フタルイミド (1.75 g) と 1, 8 - ジアザビシクロ [5. 4. 0] - 7 - ウンデセン (1.1 mL) を追加し、更に 1 日間攪拌した。反応液に水を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [酢酸エチル / メタノール] で精製し、標題化合物 (12.4 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.83 (1H, s), 7.76–7.67 (4H, m), 7.64 (1H, s), 7.35–7.33 (2H, m), 7.25–7.11 (7H, m), 6.74–6.70 (4H, m), 5.93 (1H, d, $J=5.1\text{ Hz}$), 5.68 (1H, d, $J=3.9\text{ Hz}$), 4.71 (1H, q, $J=4.8\text{ Hz}$), 4.43 (1H, m), 4.37–4.18 (3H, m), 4.10–4.06 (2H, m), 3.730 (3H, s), 3.728 (3H, s), 3.51 (1H, m), 3.36 (1H, dd, $J=10.6, 3.9\text{ Hz}$), 3.32 (1H, dd, $J=11.0, 5.5\text{ Hz}$).

[0339] (工程2)

5' - O - [ビス (4 - メトキシフェニル) (フェニル) メチル] - 3' - O - [tert - ブチル (ジメチル) シリル] - 1 - [2 - (1, 3 - ジオキソ - 1, 3 - ジヒドロ - 2H - イソインドール - 2 - イル) エチル] イノシン

上記工程1で得られた化合物 (12.4 g) を用いて、実施例1工程10と同様の手法で反応を行い、標題化合物 (4.18 g) と標題化合物の位置異性体である 5' - O - [ビス (4 - メトキシフェニル) (フェニル) メチル]

ル] - 2' - O - [tert-ブチル (ジメチル) シリル] - 1 - [2 - (1, 3-ジオキソ-1, 3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル) エチル] イノシン (6.31 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.00 (1H, s), 7.82-7.77 (2H, m), 7.74 (1H, s), 7.72-7.67 (2H, m), 7.41-7.39 (2H, m), 7.32-7.19 (7H, m), 6.83-6.78 (4H, m), 5.90 (1H, d, $J=5.1\text{ Hz}$), 4.53-4.41 (3H, m), 4.32-4.25 (1H, m), 4.19-4.11 (3H, m), 3.79 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.46 (1H, dd, $J=10.6, 3.1\text{ Hz}$), 3.24 (1H, dd, $J=10.8, 4.1\text{ Hz}$), 2.98 (1H, d, $J=6.7\text{ Hz}$), 0.85 (9H, s), 0.04 (3H, s), -0.03 (3H, s) .

位置異性体 (2' - O - TBS 体)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.97 (1H, s), 7.82-7.78 (2H, m), 7.73-7.69 (2H, m), 7.66 (1H, s), 7.44-7.41 (2H, m), 7.33-7.18 (7H, m), 6.81 (4H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 5.91 (1H, d, $J=5.9\text{ Hz}$), 4.82 (1H, t, $J=5.5\text{ Hz}$), 4.43 (1H, m), 4.34-4.23 (3H, m), 4.18-4.08 (2H, m), 3.79 (6H, s), 3.46 (1H, dd, $J=10.6, 2.7\text{ Hz}$), 3.36 (1H, dd, $J=10.6, 3.5\text{ Hz}$), 2.70 (1H, d, $J=3.1\text{ Hz}$), 0.83 (9H, s), -0.04 (3H, s), -0.19 (3H, s) .

[0340] (工程3)

5' - O - [ビス (4-メトキシフェニル) (フェニル) メチル] - 3' - O - [tert-ブチル (ジメチル) シリル] - 2' - O - { (2-シアノエトキシ) [ジ (プロパン-2-イル) アミノ] ホスファニル} - 1 - [2

－（１，３－ジオキソ－１，３－ジヒドロ－２Ｈ－イソインドール－２－イル）エチル］イノシン

上記工程２で得られた化合物（８．８９ｇ）を用いて、実施例１工程６と同様の手法で反応を行い、標題化合物（９．４５ｇ）をリン原子上のジアステレオマー混合物（ジアステレオマー比＝１：１）として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.01 (0.5H, s), 8.00 (0.5H, s), 7.82–7.77 (2H, m), 7.74 (0.5H, s), 7.72–7.67 (2.5H, m), 7.42 (2H, d, $J=7.8$ Hz), 7.33–7.18 (7H, m), 6.81 (4H, d, $J=8.6$ Hz), 6.10 (0.5H, d, $J=5.5$ Hz), 6.04 (0.5H, d, $J=5.1$ Hz), 4.75 (0.5H, m), 4.60 (0.5H, m), 4.49–4.41 (1H, m), 4.38–4.23 (2H, m), 4.22–4.05 (3H, m), 3.79 (6H, s), 3.78–3.65 (1H, m), 3.62–3.39 (4H, m), 3.33–3.23 (1H, m), 2.49 (1H, t, $J=6.3$ Hz), 2.34 (1H, t, $J=6.7$ Hz), 1.12–1.08 (9H, m), 0.91 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.82 (9H, s), 0.06 (1.5H, s), 0.03 (1.5H, s), –0.03 (3H, s).

[0341] (工程４)

４－クロロ－５－ヨード－７－{ [２－（トリメチルシリル）エトキシ] メチル }－７Ｈ－ピロロ [２，３－*d*] ピリミジン

市販 (PharmaBlock) の４－クロロ－５－ヨード－７Ｈ－ピロロ [２，３－*d*] ピリミジン (73.8g) の N ， N －ジメチルホルミアミド (10mL) 溶液に、氷冷下で水素化ナトリウム (ミネラルオイルを45%含有) (13.3g) を加え、室温まで昇温しながら40分間攪拌した。再度氷冷し、[２－（クロロメトキシ）エチル]（トリメチル）シラン (51.0mL) を10分間かけて加えた後、同温度で30分間攪拌した。大部分が固化した反応液に水 (260mL) を少しずつ加えて反応を停止した。

固体を濾取し、水（1500 mL）とヘキサン（600 mL）で洗浄後、減圧下40℃で乾燥し、標題化合物（97.63 g）を得た。

MS (ESI) m/z : 410 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.64 (1H, s), 7.54 (1H, s), 5.61 (2H, s), 3.52 (2H, t, J=8.3 Hz), 0.92 (2H, t, J=8.3 Hz), -0.04 (9H, s).

[0342] (工程5)

4-(ベンジルオキシ)-5-ヨード-7-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン

ベンジルアルコール（27 mL）のN,N-ジメチルホルミアミド（170 mL）溶液に、氷冷下で水素化ナトリウム（ミネラルオイルを45%含有）（12 g）を加え、室温まで昇温しながら40分間攪拌した。再度氷冷し、上記工程4で得られた化合物（97.63 g）のN,N-ジメチルホルミアミド（360 mL）懸濁液を40分間かけて加え、同温度で35分間攪拌した。反応液に氷片と飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液と酢酸エチルの二層に注ぎ、酢酸エチル：トルエン（9：1）で抽出した。有機層を水と飽和食塩水で2回ずつ洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサン／酢酸エチル〕で精製し、標題化合物（107.7 g）を得た。

MS (ESI) m/z : 482 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.47 (1H, s), 7.61 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.41 (2H, t, J=7.6 Hz), 7.36-7.30 (1H, m), 7.30 (1H, s), 5.65 (2H, s), 5.57 (2H, s), 3.52 (2H, t, J=8.3 Hz), 0.91 (2H, t, J=8.3 Hz), -0.05 (9H, s).

[0343] (工程6)

4-(ベンジルオキシ)-5-(3,3-ジエトキシプロパー1-イン-1

－イル)－7－{[2－(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}－7H－
ピロロ[2,3-d]ピリミジン

[0344] 上記工程5で得られた化合物(113.4g)のアセトニトリル(1000 mL)－トリエチルアミン(98 mL)混合溶液に、窒素雰囲気下、室温でヨウ化銅(4.49g)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)(8.17g)、及び3,3－ジエトキシプロパー1－イン(104 mL)を加え、同温度で4.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残留物に酢酸エチルとヘキサンを加え、析出した固体を濾去した。固体を酢酸エチル：ヘキサン(1：1)の混合液で洗浄後、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン／酢酸エチル]で精製し、標題化合物(145.5g：不純物含有)を得た。

MS (ESI) m/z : 482 (M+H)⁺.

[0345] (工程7)

5－(3,3－ジエトキシプロピル)－7－{[2－(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}－7H－ピロロ[2,3-d]ピリミジン－4－オール

上記工程6で得られた化合物(145.5g)のエタノール(900 mL)溶液に、10%パラジウム炭素触媒(M) w e t (50.2g)を加え、水素雰囲気下、室温で5時間攪拌した。反応液にジクロロメタン(500 mL)を加え、セライトで触媒を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン／酢酸エチル]で2回精製し、標題化合物(59.6g)を得た。

MS (ESI) m/z : 418 (M+Na)⁺, 394 [M-H]⁻.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 11.23 (1H, b r s), 7.85 (1H, s), 6.79 (1H, s), 5.47 (2H, s), 4.58 (1H, t, J=5.9 Hz), 3.69 (2H, m), 3.57-3.49 (4H, m), 2.90 (2H, t, J=7.8 Hz), 2.07 (2H, m), 1.23 (6H, t, J=7.1 Hz), 0.91 (2H, t, J=8.1 Hz), -0.04 (9H, s).

[0346] (工程8)

5-(3,3-ジエトキシプロピル)-7-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル}-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-チオール

上記工程7で得られた化合物(59.6g)の脱水ジクロロメタン(300mL)溶液に、窒素雰囲気下、2,6-ルチジン(42mL)を加えた。トリフルオロメタンスルホン酸無水物(31mL)を-20℃で20分間かけて滴下し、同温度で20分間攪拌した。N,N-ジメチルホルムアミド(500mL)と一硫化水素ナトリウムn水和物(33.5g)を氷冷下に加え、室温まで昇温した後、2.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、低沸点成分を留去した。残留物を酢酸エチルと氷冷した飽和塩化アンモニウム水溶液の二層に注ぎ、酢酸エチル：トルエン(9：1)の混合液で抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液で1回、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサン／酢酸エチル〕で精製し、標題化合物と2,6-ルチジンの混合物を得た。得られた混合物を酢酸エチルと1規定塩酸の二層に注ぎ、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で3回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮し、標題化合物(57.6g)を得た。

MS(ESI) m/z : 410 [M-H]⁻.

¹H-NMR(CDCl₃) δ : 11.69(1H, brs), 7.90(1H, s), 6.96(1H, s), 5.49(2H, s), 4.61(1H, t, J=5.9Hz), 3.71(2H, m), 3.55(2H, m), 3.49(2H, t, J=8.1Hz), 3.14(2H, t, J=7.8Hz), 2.08(2H, m), 1.23(6H, t, J=7.1Hz), 0.90(2H, t, J=8.3Hz), -0.04(9H, s).

[0347] (工程9)

3-(4-スルファニル)-7-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メ

チル} - 7H-ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-5-イル) プロパン-1-オール

上記工程8で得られた化合物 (31.62 g) を80%酢酸水溶液 (300 mL) に溶解し、室温で30分間攪拌した。原料の消失を確認後、氷冷し、水素化ホウ素ナトリウム (1.45 g) を少量ずつ注意深く加え、同温度で30分間攪拌した。次いで、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム (24.4 g) を15分間かけて加え、同温度で1.5時間攪拌した。反応液を5分の1程度の量まで減圧濃縮した。残留物に炭酸水素ナトリウム (固体) を注意深く加えてある程度中和した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムと飽和食塩水で順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (17.93 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 340 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 11.92 (1H, brs), 7.95 (1H, s), 7.01 (1H, s), 5.51 (2H, s), 3.70 (2H, t, $J=5.9\text{ Hz}$), 3.50 (2H, t, $J=8.1\text{ Hz}$), 3.23 (2H, t, $J=7.3\text{ Hz}$), 2.33 (1H, brs), 1.99 (2H, m), 0.91 (2H, t, $J=8.3\text{ Hz}$), -0.04 (9H, s).

[0348] (工程10)

2- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] メチル} - 2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c,d] アズレン

[0349] 上記工程9で得られた化合物 (31.31 g) の脱水テトラヒドロフラン (600 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、0℃でトリフェニルホスフィン (25.4 g) とジイソプロピルアゾジカルボキシラート (21.8 g) を加え、同温度で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ジクロロメタン/酢酸エチル] 及びシリカゲルカラ

ムクロマトグラフィー [ヘキサン／酢酸エチル] で順に精製し、標題化合物 (35.93 g : 不純物含有) を得た。

MS (ESI) m/z : 322 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.57 (1H, s), 7.08 (1H, s), 5.58 (2H, s), 3.52 (2H, t, $J=8.3\text{ Hz}$), 3.17 (2H, m), 3.06 (2H, t, $J=5.6\text{ Hz}$), 2.36 (2H, m), 0.92 (2H, t, $J=8.3\text{ Hz}$), -0.05 (9H, s).

[0350] (工程11)

(8,9-ジヒドロ-6-チア-2,3,5-トリアザベンゾ [cd] アズレン-2 (7H) -イル) メタノール

上記工程10で得られた化合物 (35.93 g) のジクロロメタン (150 mL) 溶液に、室温でトリフルオロ酢酸 (150 mL) を加え、同温度で1.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、トルエンで4回共沸した。残留物にジクロロメタン : ヘキサン (1 : 2) の混合液を加え、析出した固体を濾取した (固体1)。濾液を減圧濃縮後、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン／酢酸エチル→酢酸エチル／メタノール] で精製し、固体2を得た。固体1と固体2を併せて、標題化合物 (20.13 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 222 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.60 (1H, s), 7.19 (1H, s), 5.71 (2H, s), 3.21 (2H, m), 3.07 (2H, m), 2.38 (2H, m). (観測可能なピークのみ記載)

[0351] (工程12)

2,7,8,9-テトラヒドロ-6-チア-2,3,5-トリアザベンゾ [cd] アズレン

上記工程11で得られた化合物 (20.13 g) のメタノール (250 mL) 懸濁液に、28%アンモニア水溶液 (150 mL) を加え、室温で1.

5時間攪拌した。反応液を減圧下で半分程度の量まで濃縮した。析出した固体を濾取し、エタノールで洗浄し、固体1を得た。濾液を減圧濃縮し、同様の操作で固体2を得た。濾液をシリカゲルに塗した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ジクロロメタン／メタノール〕で精製した。目的物を含むフラクションを減圧濃縮し、エタノールでスラリー洗浄後、固体を濾取した（固体3）。固体1、固体2、及び固体3を併せて、標題化合物（12.36g）を得た。

MS (ESI) m/z : 192 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 10.53 (1H, brs), 8.57 (1H, s), 7.10 (1H, s), 3.18 (2H, m), 3.08 (2H, t, $J=5.6\text{ Hz}$), 2.37 (2H, m).

[0352] (工程13)

2-(2,3,5-トリ-O-ベンジル- β -D-アラビノフラノシル)-2,7,8,9-テトラヒドロ-6-チア-2,3,5-トリアザベンゾ [cd] アズレン

上記工程12で得られた化合物（13.47g）の脱水アセトニトリル（350mL）懸濁液に、窒素雰囲気下、粉末状の水酸化カリウム（10.3g）とトリス〔2-(2-メトキシエトキシ)エチル〕アミン（1.13mL）を加え、室温で1.5時間攪拌した。氷冷下、文献既知（J. Med. Chem. 1976, 19, 6, 814-816）の2,3,5-トリ-O-ベンジル- α -D-アラビノフラノシルクロリド（40.2g）のアセトニトリル（100mL）溶液を少しずつ加えた後、室温まで昇温して4時間攪拌した。不溶物を濾去し、アセトニトリルで洗浄した。濾液を減圧濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサン／酢酸エチル〕で2回精製し、標題化合物（26.19g）を得た。

MS (ESI) m/z : 594 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.51 (1H, s), 7.37-7.17 (14H, m), 6.86 (2H, m), 6.82 (1H, d, $J=4.9$

H z), 4.68 (1H, d, $J=11.7$ Hz), 4.59 (1H, d, $J=11.7$ Hz), 4.54 (1H, d, $J=13.2$ Hz), 4.52 (1H, d, $J=11.7$ Hz), 4.36–4.33 (2H, m), 4.22 (1H, d, $J=11.7$ Hz), 4.14–4.08 (2H, m), 3.77 (1H, dd, $J=10.7, 3.9$ Hz), 3.72 (1H, dd, $J=10.5, 4.1$ Hz), 3.13 (2H, m), 2.81 (2H, m), 2.27 (2H, m).

[0353] (工程14)

2-β-D-アラビノフラノシル-2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程13で得られた化合物 (26.19 g) の脱水ジクロロメタン (300 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、 -78°C で三塩化ホウ素のジクロロメタン溶液 (1M, 200 mL) を加え、同温度で2時間攪拌した後、 0°C まで昇温して更に4時間攪拌した。反応液を再度 -78°C まで冷却し、メタノール (80 mL) のジクロロメタン (160 mL) 溶液を加え、室温まで昇温しながら30分間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、エタノールで2回共沸した。残留物にエタノール (200 mL) とジエチルエーテル (100 mL) を加えてスラリー状にし、固体を濾取した (固体1)。濾液を減圧濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ジクロロメタン/メタノール] で精製した。目的物を含むフラクションを減圧濃縮後、エタノールを加えてスラリー状にし、固体を濾取した (固体2)。固体1と固体2を併せて標題化合物 (13.2 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 324 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 8.73 (1H, s), 7.96 (1H, s), 6.70 (1H, d, $J=4.9$ Hz), 4.32 (1H, t, $J=4.6$ Hz), 4.25 (1H, t, $J=4.6$ Hz), 3.97 (1H, m), 3.90 (1H, dd, $J=12.0, 3.2$ Hz), 3.85 (1H, dd, $J=12.0, 4.6$ Hz), 3.53 (2H, m), 3.17 (

2 H, m), 2.43 (2 H, m).

[0354] (工程15)

2-[3,5-ビス-O-(オキサン-2-イル)-β-D-アラビノフラノシル]-2,7,8,9-テトラヒドロ-6-チア-2,3,5-トリアザベンゾ[c,d]アズレン

上記工程14で得られた化合物(15.35g)の脱水ジメチルスルホキシド(160mL)溶液に、0℃で3,4-ジヒドロ-2H-ピラン(17.2mL)とp-トルエンスルホン酸一水和物(9.02g)を加え、室温で3時間攪拌した。3,4-ジヒドロ-2H-ピラン(8.6mL)を追加し、45分間攪拌した後、直ぐにトリエチルアミン(13mL)を加えて反応を停止した。反応液を酢酸エチルと飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の二層に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で1回、飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ヘキサン/酢酸エチル]で精製し、標題化合物(10.81g)を4種類のジアステレオマー混合物として得た。

MS (ESI) m/z : 492 [M+H]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.548 (0.2H, s), 8.546 (0.3H, s), 8.54 (0.3H, s), 8.53 (0.2H, s), 7.54 (0.2H, s), 7.53 (0.3H, s), 7.51 (0.2H, s), 7.44 (0.3H, s), 6.75 (0.2H, d, J=5.4Hz), 6.71 (0.2H, d, J=5.9Hz), 6.57 (0.3H, d, J=5.9Hz), 6.56 (0.3H, d, J=5.9Hz), 4.87-4.69 (2H, m), 4.55-3.54 (10H, m), 3.18-3.12 (2H, m), 3.10-2.96 (2H, m), 2.40-2.30 (2H, m), 1.92-1.51 (12H, m).

[0355] (工程16)

2-[2-デオキシ-2-フルオロ-3,5-ビス-O-(オキサン-2-

イル) - β -D-リボフラノシル] - 2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チアー-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程 15 で得られた化合物 (10.81 g) の脱水ジクロロメタン (150 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、0℃でピリジン (5.3 mL) とトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (5.6 mL) を加え、同温度で1時間攪拌した。反応液に氷片を入れて反応を停止した後、反応液を酢酸エチルと飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の二層に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮し、トリフラートの粗体をアモルファスとして得た。得られたトリフラートの粗体を脱水テトラヒドロフラン (150 mL) に溶解し、氷冷下でフッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液 (約 1 M, 154 mL) を少しずつ加え、同温度で終夜攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液を半分程度の量まで減圧濃縮した。残留物を酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム水溶液の二層に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液で1回、飽和食塩水で2回洗浄した。水層を酢酸エチルで再度抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄した。有機層を併せて無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮し、標題化合物 (40.37 g) の粗体を得た。

MS (ESI) m/z : 494 [M+H]⁺.

[0356] (工程 17)

2 - (2-デオキシ-2-フルオロ- β -D-リボフラノシル) - 2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チアー-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン

上記工程 16 で得られた化合物 (40.37 g) のメタノール (400 mL) 溶液に p-トルエンスルホン酸一水和物 (2.09 g) を加え、60℃で4時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン (16 mL) を加えて反応を停止した。反応液を減圧濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフ

ィー [ヘキサン／酢酸エチル→酢酸エチル／メタノール] で精製した。目的物を含むフラクションをスラリー状になるまで減圧濃縮し、固体を濾取した。得られた固体をヘキサン／酢酸エチル (1 : 1) で洗浄し、固体 1 を得た。濾液を減圧濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ジクロロメタン／メタノール] で精製し、固体 2 を得た。固体 1 と固体 2 を併せて標題化合物 (5.32 g) 得た。

MS (ESI) m/z : 326 [M+H]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.51 (1H, s), 7.01 (1H, s), 6.00 (1H, dd, J=13.7, 6.3 Hz), 5.95 (1H, dd, J=11.7, 2.0 Hz), 5.87 (1H, ddd, J=52.7, 6.3, 4.9 Hz), 4.69 (1H, m), 4.32 (1H, brs), 3.96 (1H, d, J=12.7 Hz), 3.77 (1H, m), 3.17 (2H, m), 3.04 (2H, m), 2.41–2.31 (3H, m).

[0357] (工程 18)

2- {5-O- [ビス (4-メトキシフェニル) (フェニル) メチル] -2-デオキシ-2-フルオロ- β -D-リボフラノシル} -2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [cd] アズレン

上記工程 17 で得られた化合物 (5.32 g) を用いて、実施例 2 工程 10 と同様の手法を用いて反応を行い、標題化合物 (10.1 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 628 [M+H]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.54 (1H, s), 7.42 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.32–7.21 (8H, m), 6.81 (4H, m), 6.52 (1H, dd, J=17.3, 2.2 Hz), 5.37 (1H, ddd, J=53.3, 4.4, 2.4 Hz), 4.76 (1H, m), 4.16 (1H, m), 3.789 (3H, s), 3.786 (3H, s), 3.59 (1H, dd, J=10.7, 2.4 Hz), 3.44 (1H, dd, J=10.7, 3.4 Hz), 3.12 (2H, m), 2.76 (

2 H, t, $J=5.6$ Hz), 2.27 (2 H, m), 2.18 (1 H, d, $J=7.8$, 2.9 Hz).

[0358] (工程19)

2-(5-O-[ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メチル]-3-O-{(2-シアノエトキシ)[ジ(プロパン-2-イル)アミノ]ホスファニル}-2-デオキシ-2-フルオロ- β -D-リボフラノシル)-2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ[c]アズレン

上記工程18で得られた化合物(10.1 g)を用いて、実施例1工程6と同様の手法で反応を行い、標題化合物(12.6 g)をリン原子上のジアステレオマー混合物(ジアステレオマー比=1:1)として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.53 (1 H, s), 7.40 (2 H, m), 7.34-7.17 (8 H, m), 6.84-6.74 (4 H, m), 6.53 (0.5 H, dd, $J=17.3$, 2.2 Hz), 6.48 (0.5 H, dd, $J=17.6$, 1.5 Hz), 5.50-5.31 (1 H, m), 4.99 (0.5 H, m), 4.85 (0.5 H, m), 4.31-4.26 (1 H, m), 3.93-3.76 (1 H, m), 3.792 (1.5 H, s), 3.789 (1.5 H, s), 3.779 (1.5 H, s), 3.776 (1.5 H, s), 3.67-3.51 (4 H, m), 3.34-3.30 (1 H, m), 3.13-3.10 (2 H, m), 2.76-2.69 (2 H, m), 2.61 (1 H, td, $J=6.3$, 2.4 Hz), 2.39 (1 H, m), 2.28-2.21 (2 H, m), 1.19-1.15 (9 H, m), 1.03 (3 H, d, $J=6.8$ Hz).

[0359] (工程20)

上記工程19で得られた化合物(1.80 g)を用いて、実施例1工程7と同様の手法で反応を行い、2-{2-デオキシ-2-フルオロ-3-O-[ヒドロキシ(オキソ)- λ^5 -ホスファニル]- β -D-リボフラノシル}-2, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ

[c d] アズレンのアセトニトリル溶液を得た。得られたアセトニトリル溶液と上記工程 3 で得られた化合物 (2.30 g) を用いて、実施例 1 工程 12 と同様の手法で反応を行い、得られた粗生成物をそのまま次の反応に用いた。

[0360] (工程 21)

3- { [(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -16- { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -14- (8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン-2 (7H) -イル) -7- {1- [2- (1, 3-ジオキソ-1, 3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル) エチル] -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル} -15-フルオロ-2-オキソ-2-スルファニル-10-スルファニリデンオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-10-イル] オキシ} プロパンニトリル

[0361] 上記工程 20 で得られた粗生成物を用いて、実施例 1 工程 13 と同様の手法で反応を行い、標題化合物 (1.22 g) をリン原子上のジアステレオマー混合物として得た。

MS (ESI) m/z : 1090 (M+H)⁺.

[0362] (工程 22)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -7- [1- (2-アミノエチル) -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル] -16- { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -14- (8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン-2 (7H) -イル) -15-フルオロ-2, 10-ジオキソオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシ

ン-2, 10-ビス (チオラート)

[0363] 上記工程21で得られた化合物 (1.22 g) のエタノール (10 mL) - テトラヒドロフラン (10 mL) 混合溶液に、ヒドラジン-水和物 (0.544 mL) を加え、室温で15時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残留物をC18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] で精製し、標題化合物のジアステレオマー1 (108 mg : 不純物含有) とジアステレオマー2 (111 mg : 不純物含有) を得た。

ジアステレオマー1 (低極性)

MS (ESI) m/z : 907 (M+H)⁺.

ジアステレオマー2 (高極性)

MS (ESI) m/z : 907 (M+H)⁺.

[0364] (工程23-1)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) - 7 - [1 - (2-アミノエチル) - 6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル] - 14 - (8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [cd] アズレン-2 (7H) -イル) - 15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート)

(ジアステレオマー1)

[0365] 上記工程22で得られた化合物 (ジアステレオマー1) (108 mg : 不純物含有) を用いて、実施例1工程15-1と同様の手法で反応を行った後、以下の [精製条件] で精製し、標題化合物をトリエチルアミン塩として得た。

[精製条件] C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] 及び分取HPLC [10 m

M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液／アセトニトリル－メタノール溶液（１：１），アセトニトリル－メタノール溶液（１：１）：１０％－５０％（０分－４０分）］．

得られたトリエチルアミン塩を、実施例１工程１５－１に記載の［ナトリウム塩への変換］と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物（４４．４ｍｇ）を得た。

MS (ESI) m/z : 793 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.50 (1H, s), 8.42 (1H, s), 7.92 (1H, s), 7.56 (1H, s), 6.56 (1H, d, J=16.3 Hz), 6.21 (1H, d, J=6.0 Hz), 5.57–5.40 (2H, m), 5.35–5.22 (1H, m), 4.73–4.67 (1H, m), 4.58–4.49 (1H, m), 4.45–4.26 (4H, m), 4.24–4.15 (1H, m), 4.05–3.96 (1H, m), 3.78–3.51 (1H, m), 3.26–3.06 (4H, m), 2.93–2.82 (1H, m), 2.70–2.51 (1H, m), 2.29–2.07 (2H, m).

³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 57.5 (s), 52.9 (s).

[0366] (工程２３－２)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)－7－[1－(2－アミノエチル)－6－オキソ－1, 6－ジヒドロ－9H－プリン－9－イル]－14－(8, 9－ジヒドロ－6－チア－2, 3, 5－トリアザベンゾ[c d]アズレン－2 (7H)－イル)－15－フルオロ－16－ヒドロキシ－2, 10－ジオキソオクタヒドロ－2H, 10H, 12H－5, 8－メタノ－2λ⁵, 10λ⁵－フロ[3, 2－I] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン－2, 10－ビス (チオラート)

(ジアステレオマー２)

[0367] 上記工程２２で得られた化合物 (ジアステレオマー２) (111mg : 不

純物含有)を用いて、実施例1工程15-1と同様の手法で反応を行った後、以下の〔精製条件〕で精製し、標題化合物をトリエチルアミン塩として得た。

〔精製条件〕C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー〔10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液／アセトニトリル〕、分取HPLC〔10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液／アセトニトリル、アセトニトリル：5%－25%（0分－40分）〕、及び分取HPLC〔10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液／メタノール、メタノール：20%－60%（0分－40分）〕。

得られたトリエチルアミン塩を、実施例1工程15-1に記載の〔ナトリウム塩への変換〕と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物（40.6mg）を得た。

MS (ESI) m/z : 793 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.57 (1H, s), 8.41 (1H, s), 8.13 (1H, s), 7.72 (1H, s), 6.59 (1H, dd, J=15.7, 1.8 Hz), 6.26 (1H, d, J=8.5 Hz), 5.61－5.34 (3H, m), 4.57－4.48 (2H, m), 4.48－4.38 (2H, m), 4.38－4.28 (2H, m), 4.08－3.98 (3H, m), 3.29－3.21 (2H, m), 3.20－3.12 (2H, m), 3.02－2.92 (1H, m), 2.92－2.81 (1H, m), 2.29－2.15 (2H, m).

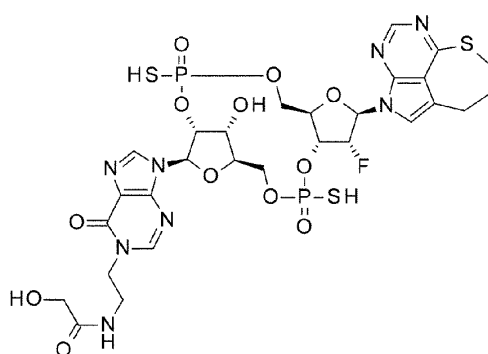
³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 58.7 (s), 57.8 (s).

[0368] 実施例4 : CDN50の合成

N-(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-14-(8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ[c,d]アズレン-2(7H)-イル)-15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ビス(スルファニル)オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ

[3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル] -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エチル) -2-ヒドロキシアセトアミド

[0369] [化99]



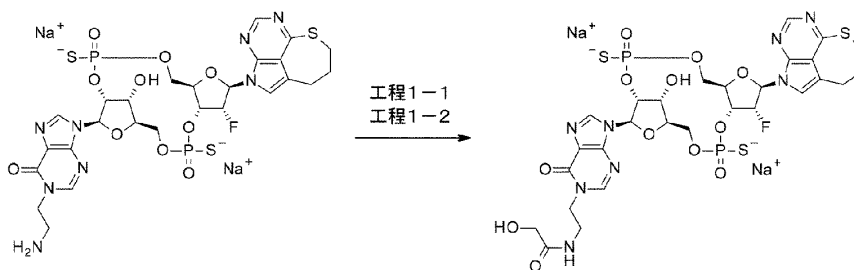
50

50a (ジアステレオマー1)

50b (ジアステレオマー2)

[0370] [合成スキーム]

[0371] [化100]



[0372] (工程1-1)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -14- (8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン-2 (7H) -イル) -15-フルオロ-16-ヒドロキシ-7- {1- [2- (2-ヒドロキシアセトアミド) エチル] -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル} -2, 10-ジオキソオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ

5-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジ
ホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート)

(ジアステレオマー1)

[0373] 実施例3工程23-1で得られた化合物 (20.0 mg) のN, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) 溶液に、トリエチルアミン (17 μ L) と1-[(ヒドロキシアセチル) オキシ] ピロリジン-2, 5-ジオン (10.3 mg) を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を10 mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液で希釈し、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] 及び分取HPLC [10 mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 10%-30% (0分-40分)] で精製した。得られた化合物 (トリエチルアミン塩) を、実施例1工程15-1に記載の [ナトリウム塩への変換] と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物 (15.6 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 851 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.43 (1H, s), 8.40 (1H, br s), 7.66 (1H, br s), 7.58 (1H, s), 6.53 (1H, d, J=16.3 Hz), 6.14 (1H, d, J=8.5 Hz), 5.73-5.64 (1H, m), 5.59-5.42 (1H, m), 5.42-5.29 (1H, m), 4.80-4.74 (1H, m), 4.53-4.26 (5H, m), 4.21-4.12 (1H, m), 3.99-3.92 (1H, m), 3.83 (2H, s), 3.66-3.56 (1H, m), 3.43-3.26 (2H, m), 3.23-3.06 (2H, m), 2.89-2.79 (1H, m), 2.49-2.33 (1H, m), 2.27-2.15 (1H, m), 2.15-2.02 (1H, m).

³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 57.0 (s), 52.6 (s).

[0374] (工程1-2)

ジナトリウム (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR

, 16R) - 14 - (8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン-2 (7H) -イル) - 15-フルオロ-16-ヒドロキシ-7 - {1 - [2 - (2-ヒドロキシアセトアミド) エチル] - 6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル} - 2, 10-ジオキソオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート) (ジアステレオマー2)

[0375] 実施例3工程23-2で得られた化合物 (10.0mg) を用いて、上記工程1-1と同様の手法で反応を行った後、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] 及び分取HPLC [10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 7%-25% (0分-40分)] で精製した。得られた化合物 (トリエチルアミン塩) を、実施例1工程15-1に記載の [ナトリウム塩への変換] と同様の手法で塩交換を行い、標題化合物 (6.6mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 851 (M+H)⁺.

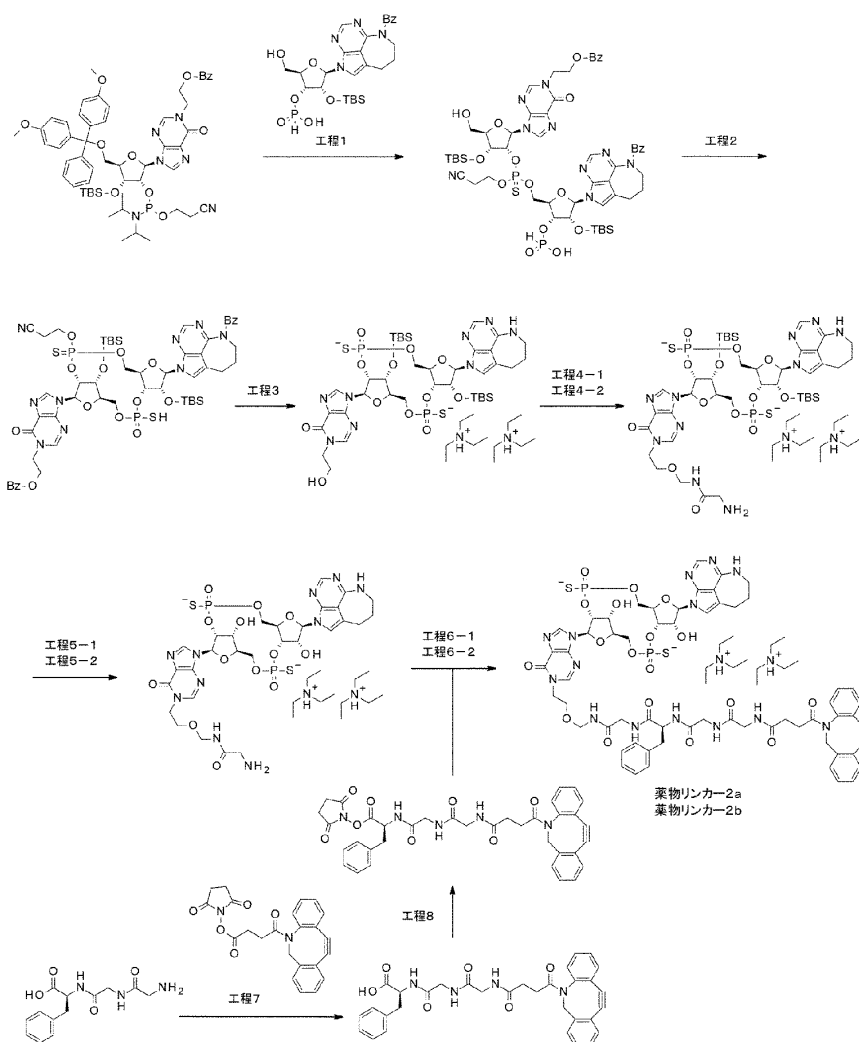
¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.46 (1H, s), 8.42 (1H, s), 7.84 (1H, s), 7.78 (1H, s), 6.59 (1H, d, J=15.1Hz), 6.20 (1H, d, J=7.9Hz), 5.69-5.38 (3H, m), 4.60-4.50 (2H, m), 4.48-4.38 (2H, m), 4.31-4.20 (2H, m), 4.10-3.93 (2H, m), 3.87 (2H, s), 3.73-3.57 (2H, m), 3.52-3.41 (1H, m), 3.25-3.10 (2H, m), 3.01-2.90 (1H, m), 2.83-2.71 (1H, m), 2.30-2.11 (2H, m).

³¹P-NMR (CD₃OD) δ : 58.2 (s), 57.6 (s).

[0376] 実施例5 : 薬物リンカー2の合成

[合成スキーム]

[0377] [化101]



[0378] (工程1)

実施例1工程7と同じ反応を以下のスケールで実施した(原料: 1.40 g)。得られた化合物のアセトニトリル溶液と実施例2工程3で得られた化合物(1.41 g)を用いて、実施例1工程12と同様の手法で反応を行った。得られた粗生成物をそのまま次の反応に用いた。

[0379] (工程2)

2- {9- [(5 R, 7 R, 8 R, 12 a R, 14 R, 15 R, 15 a R, 16 R) -14- (6-ベンゾイル-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2 H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル) -15, 16-ビス { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -10- (2-シアノエトキシ) -2-オキソ-2-スルファニル-10-スルファニリデンオクタヒドロ-2 H, 10 H, 12 H-5, 8-メタノ-2 λ⁵, 10 λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル] -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1 H-プリン-1-イル} エチル ベンゾエート

上記工程1で得られた粗生成物を用いて、実施例1工程13と同様の手法で反応を行い、標題化合物 (778 mg) をリン原子上のジアステレオマー混合物として得た。

MS (ESI) m/z : 1264 (M+H)⁺.

[0380] (工程3)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5 R, 7 R, 8 R, 12 a R, 14 R, 15 R, 15 a R, 16 R) -15, 16-ビス { [tert-ブチル (ジメチル) シリル] オキシ} -7- [1- (2-ヒドロキシエチル) -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9 H-プリン-9-イル] -2, 10-ジオキソ-14- (6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2 H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2 H, 10 H, 12 H-5, 8-メタノ-2 λ⁵, 10 λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート)

[0381] 上記工程2で得られた化合物 (778 mg) を用いて、実施例1工程14と同様の手法で反応を行い、標題化合物のジアステレオマー1 (255 mg) とジアステレオマー2 (不純物含有) を得た。ジアステレオマー2を分取 HPLC [水/0.2% トリエチルアミン含有アセトニトリル, 0.2% トリエチルアミン含有アセトニトリル : 5%-50% (0分-40分)] で再

度精製し、標題化合物のジアステレオマー2 (94.6 mg) を得た。

ジアステレオマー1 (低極性)

MS (ESI) m/z : 1003 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.66 (1H, s), 8.21 (1H, s), 8.04 (1H, s), 7.33 (1H, s), 6.27 (1H, d, J=5.1 Hz), 6.25 (1H, d, J=3.6 Hz), 5.39–5.29 (1H, m), 5.18–5.11 (1H, m), 4.85–4.81 (1H, m), 4.79–4.74 (1H, m), 4.71–4.66 (1H, m), 4.50–4.42 (1H, m), 4.36–4.21 (2H, m), 4.09–3.98 (2H, m), 3.85–3.78 (2H, m), 3.78–3.69 (2H, m), 3.55–3.46 (2H, m), 3.17 (12H, q, J=7.3 Hz), 2.98–2.75 (2H, m), 2.05–1.88 (2H, m), 1.28 (18H, t, J=7.3 Hz), 0.98 (9H, s), 0.85 (9H, s), 0.31 (3H, s), 0.27 (3H, s), 0.25 (3H, s), 0.09 (3H, s).

ジアステレオマー2 (高極性)

MS (ESI) m/z : 1003 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.50 (1H, s), 8.22 (1H, s), 8.07 (1H, s), 7.20 (1H, s), 6.33 (1H, d, J=7.3 Hz), 6.26 (1H, d, J=9.1 Hz), 5.59–5.44 (1H, m), 5.38–5.32 (1H, m), 5.21–5.11 (1H, m), 4.99–4.89 (2H, m), 4.68–4.54 (2H, m), 4.25–4.12 (3H, m), 4.09–4.03 (1H, m), 3.90–3.80 (3H, m), 3.59–3.51 (2H, m), 3.20 (12H, q, J=7.3 Hz), 2.96–2.89 (2H, m), 2.07–1.98 (2H, m), 1.30 (18H, t, J=7.3 Hz), 0.99 (9H, s), 0.74 (9H, s), 0.27 (3

H, s), 0.27 (3H, s), 0.20 (3H, s), -0.05 (3H, s).

[0382] (工程4-1)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-15, 16-ビス{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7-(1-{2-[(グリシルアミノ)メトキシ]エチル}-6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル)-2, 10-ジオキソ-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-yl)オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-l][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス(チオラート)

(ジアステレオマー1)

[0383] 上記工程3で得られた化合物(ジアステレオマー1)(30mg)のテトラヒドロフラン(0.5mL)溶液に[(N-{[(9H-フルオレン-9-イル)メトキシ]カルボニル}グリシル)アミノ]メチルアセテート(91.7mg)とp-トルエンスルホン酸1水和物(11.8mg)を加え、室温で6時間攪拌した。反応液にN, N-ジメチルホルムアミド(0.5mL)と1, 8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(56μL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液を加え、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル]で精製し、不純物として原料を含む標題化合物(25.6mg)を得た。

MS(ESI)m/z: 1089 (M+H)⁺.

[0384] (工程4-2)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-15, 16-ビス{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-7-(1-{2-[(グリシルア

ミノ) メトキシ] エチル} -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン
 -9-イル) -2, 10-ジオキソ-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒド
 ロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル
) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵
 -フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジ
 ホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート)

(ジアステレオマー2)

[0385] 上記工程3で得られた化合物 (ジアステレオマー2) (84.6 mg) を
 用いて、上記工程4-1と同様の手法で反応を行い、不純物として原料を含
 む標題化合物 (70.9 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 1089 (M+H)⁺.

[0386] (工程5-1)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12a
 R, 14R, 15R, 15aS, 16R) -7-(1-{2-[(グリシル
 アミノ) メトキシ] エチル} -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリ
 ン-9-イル) -15, 16-ジヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-14-
 (6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベン
 ゾ [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5
 , 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 1
 1, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビ
 ス (チオラート) ジアステレオマー1

[0387] 上記工程4-1で得られた化合物 (25.6 mg) にトリエチルアミン三
 フッ化水素酸塩 (2 mL) を加え、45℃で3時間攪拌した。室温下、反応
 液に氷冷した1M炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液 (10 mL) とトリ
 エチルアミン (2 mL) の混合液を加えた。反応液を減圧濃縮後、C18シ
 リカゲルカラムクロマトグラフィー (10 mM酢酸トリエチルアンモニウム
 水溶液/アセトニトリル) で精製し、標題化合物 (16.6 mg : 工程7-
 1の原料由来の不純物を含む) を得た。

MS (ESI) m/z : 861 (M+H)⁺.

[0388] (工程5-2)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aS, 16R) - 7 - (1 - {2 - [(グリシルアミノ)メトキシ]エチル} - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9H - プリン - 9 - イル) - 15, 16 - ジヒドロキシー - 2, 10 - ジオキソ - 14 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [cd] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2H, 10H, 12H - 5, 8 - メタノ - 2λ⁵, 10λ⁵ - フロ [3, 2 - I] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2, 10 - ビス (チオラート)

(ジアステレオマー2)

上記工程4-2で得られた化合物 (70.9 mg) を用いて、上記工程5-1と同様の手法で反応を行い、標題化合物 (51.7 mg : 工程4-2の原料由来の不純物を含む) を得た。

MS (ESI) m/z : 861 (M+H)⁺.

[0389] (工程6-1)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - フェニルアラニル - N - [(2 - {9 - [(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aS, 16R) - 15, 16 - ジヒドロキシー - 2, 10 - ジオキソ - 2, 10 - ジスルフィド - 14 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [cd] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2H, 10H, 12H - 5, 8 - メタノ - 2λ⁵, 10λ⁵ - フロ [3, 2 - I] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 7 - イル] - 6 - オキソ - 6, 9 - ジヒドロ - 1H - プリン - 1 - イル} エトキシ)メチル] グリシンアミド

(薬物リンカー 2 a : ジアステレオマー 1)

[0390] 上記工程 5-1 で得られた化合物 (16.6 mg) の N, N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) 溶液にトリエチルアミン (6 μ L) と後述の工程 8 で得られた化合物 (15.5 mg) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応液にベンジルアミン (3 μ L) を加え、室温で 1 時間攪拌した。10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液とメタノールを加え、C18 シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] と分取 HPLC [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 10%-45% (0 分-30 分)] で精製し、標題化合物 (5.1 mg) を得た。

MS (ESI) m/z : 1409 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.66-8.60 (1H, m), 8.17 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.65-7.48 (2H, m), 7.43-7.36 (3H, m), 7.31-7.13 (8H, m), 7.11 (1H, s), 6.30-6.21 (2H, m), 5.46-5.37 (1H, m), 5.23-5.16 (1H, m), 5.08-4.99 (1H, m), 4.86-4.81 (1H, m), 4.80-4.75 (1H, m), 4.70-4.40 (7H, m), 4.40-4.20 (3H, m), 4.10-3.97 (3H, m), 3.86-3.58 (8H, m), 3.51-3.43 (3H, m), 3.18 (12H, q, J=7.3 Hz), 3.01-2.93 (1H, m), 2.85-2.72 (3H, m), 2.37-2.15 (2H, m), 2.01-1.93 (2H, m), 1.29 (18H, t, J=7.3 Hz). (観測可能なピークのみ記載)

[0391] (工程 6-2)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aS, 16R)-

15, 16-ジヒドロキシー-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィド-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-yl)オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル]-6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル}エトキシ)メチル]グリシンアミド

(薬物リンカー2b:ジアステレオマー2)

上記工程5-2で得られた化合物(51.7mg)を用いて、上記工程6-1と同様の手法で反応を行った後、以下の[精製条件]で精製を行い、標題化合物(33.7mg)を得た。

[精製条件]C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル]、分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル:10%-50%(0分-30分)]。

MS(ESI)m/z:1409(M+H)⁺.

¹H-NMR(CD₃OD)δ:8.73(1H, d, J=6.7Hz), 8.19(1H, d, J=3.0Hz), 8.02(1H, s), 7.66-7.50(2H, m), 7.43-7.37(3H, m), 7.33-7.13(8H, m), 7.11(1H, s), 6.33-6.23(2H, m), 5.51-5.38(2H, m), 5.04(1H, t, J=13.6Hz), 4.83-4.77(1H, m), 4.64-4.55(2H, m), 4.52-4.26(6H, m), 4.25-3.97(2H, m), 3.93-3.45(13H, m), 3.19(12H, q, J=7.3Hz), 3.17-3.11(1H, m), 3.02-2.92(1H, m), 2.91-2.73(3H, m), 2.40-2.24(2H, m), 2.07-1.95(3H, m), 1.30(18H, t, J=7.3Hz).

[0392] (工程7)

N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニン

市販(BACHEM)の(2S)-2-[[2-[(2-アミノアセチル)アミノ]アセチル]アミノ]-3-フェニルプロパン酸(2.86g)のN,N-ジメチルホルムアミド(51.2mL)溶液にトリエチルアミン(2.56mL)と市販(Click Chemistry Tools)の1-{[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]オキシ}ピロリジン-2,5-ジオン(3.69g)を加え、室温で24時間攪拌した。反応液にクエン酸-水和物(24.0g)の水(500mL)溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物を酢酸エチル/アセトニトリル混合溶液に溶解させた後、ジイソプロピルエーテルで析出させて濾取し、標題化合物(4.30g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 12.8 (1H, brs), 8.15-7.95 (3H, m), 7.68-7.17 (13H, m), 5.01 (1H, d, $J=14.2\text{ Hz}$), 4.41-4.37 (1H, m), 3.74-3.57 (5H, m), 3.05-3.01 (1H, m), 2.87 (1H, dd, $J=14.2, 9.3\text{ Hz}$), 2.68-2.59 (1H, m), 2.32-2.25 (1H, m), 2.09-2.03 (1H, m), 1.82-1.76 (1H, m).

[0393] (工程8)

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニネート

上記工程7で得られた化合物(2.10g)のN,N-ジメチルホルムア

ミド (75.9 mL) 溶液に N-ヒドロキシスクシンイミド (961 mg) と 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (1.60 g) を加え、窒素雰囲気下、室温で 21 時間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、氷水で 3 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物にトルエンを加え、再度減圧濃縮した。残留物をアセトニトリルに溶解し、C18 シリカゲルカラムクロマトグラフィー [アセトニトリル:100%] で精製した。目的物を含むフラクションを減圧濃縮後、残留物にジイソプロピルエーテルを加えてスラリー状にした。得られた固体を濾取し、標題化合物 (2.59 g) を得た。

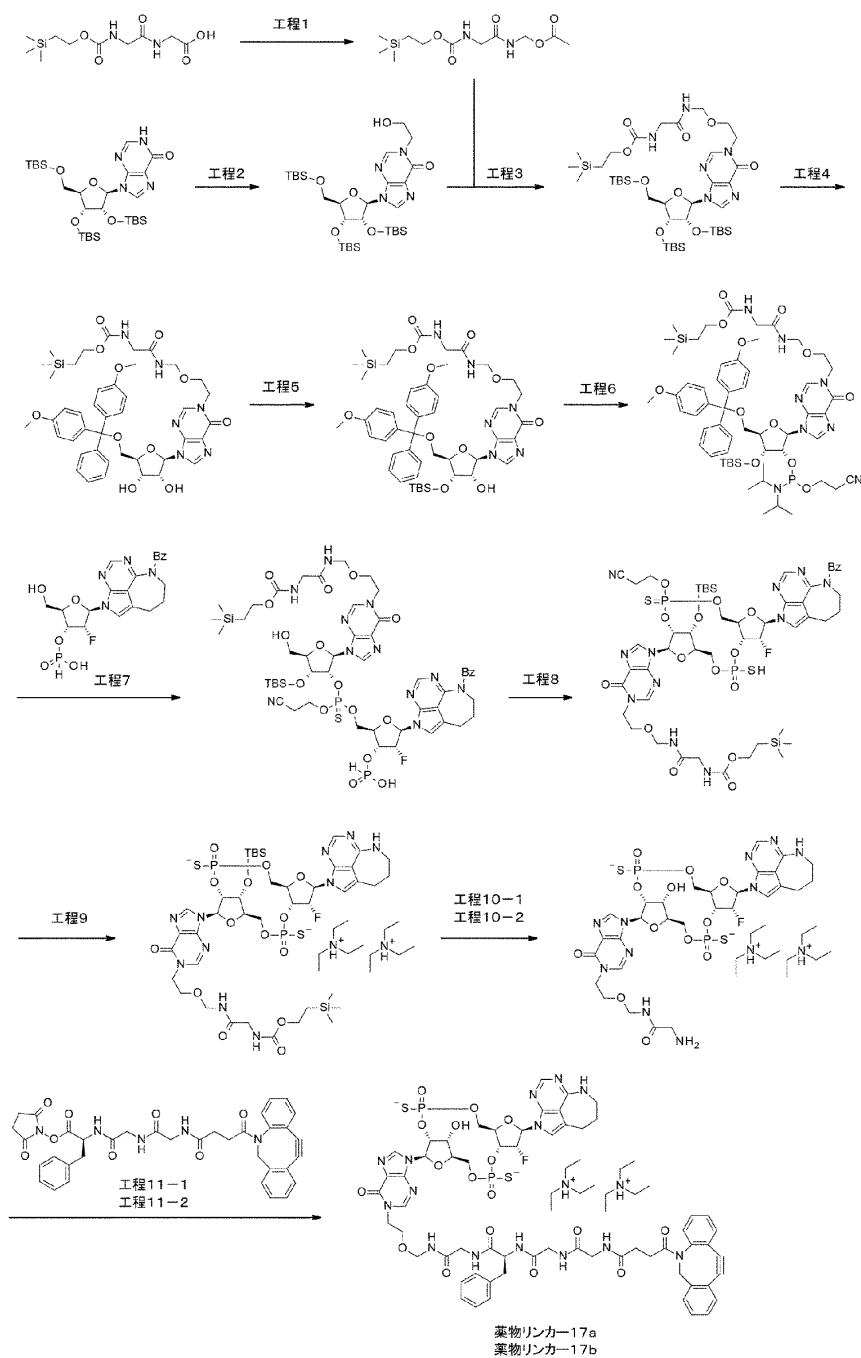
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.58–8.51 (1H, m), 8.17–8.00 (2H, m), 7.66–7.20 (13H, m), 5.02–4.98 (1H, m), 4.90–4.85 (1H, m), 3.78–3.57 (5H, m), 3.24–3.19 (1H, m), 3.06–3.00 (1H, m), 2.82 (4H, brs), 2.67–2.58 (1H, m), 2.32–2.23 (1H, m), 2.09–2.02 (1H, m), 1.82–1.75 (1H, m).

[0394] 実施例 6: 薬物リンカー 17 の合成

[合成スキーム]

[0395]

[化102]



[0396] (工程1)

〔(N-〔2-(トリメチルシリル)エトキシ〕カルボニル〕グリシル)アミノ〕メチル アセテート

市販 (SUNDIA) の N- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] カルボニル} グリシルグリシン (9.32 g) のテトラヒドロフラン (100 mL) - トルエン (33.3 mL) 混合液に、室温でピリジン (3.26 mL) と四酢酸鉛 (17.9 g) を加え、65℃で3時間攪拌した。不溶物を濾去し、テトラヒドロフランで洗浄後、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (8.24 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.14 (1H, brs), 5.27 (2H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 5.20 (1H, brs), 4.22-4.16 (2H, m), 3.88 (2H, d, $J=6.0\text{ Hz}$), 2.08 (3H, s), 1.04-0.97 (2H, m), 0.05 (9H, s).

[0397] (工程2)

2', 3', 5' - トリス-O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] - 1- (2-ヒドロキシエチル) イノシン

文献既知 (Chem. Pharm. Bull. 1987, 35 (1), 72-79) の 2', 3', 5' - トリス-O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] イノシン (31.3 g) のテトラヒドロフラン (75 mL) - N, N-ジメチルアセトアミド (75 mL) 混合溶液に、2-ブプロモエタノール (4.82 mL) と 1, 8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-ウンデセン (7.65 mL) を加え、室温で23時間攪拌した。反応液に、水と酢酸エチルを加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (29.4 g) を得た。

MS (ESI) m/z : 655 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.16 (1H, s), 7.99 (1H, d, $J=2.4\text{ Hz}$), 5.97 (1H, d, $J=4.2\text{ Hz}$), 4.40-4.25 (3H, m), 4.18-4.06 (3H, m), 4.03-3.

9.2 (2H, m), 3.79 (1H, dd, $J = 11.5, 2.4$ Hz), 3.08–2.83 (1H, br m), 0.96 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.82 (9H, s), 0.15 (3H, s), 0.14 (3H, s), 0.09 (3H, s), 0.08 (3H, s), –0.02 (3H, s), –0.15 (3H, s).

[0398] (工程3)

2', 3', 5' – トリス – O – [tert – ブチル (ジメチル) シリル] – 1 – (2 – { [(N – { [2 – (トリメチルシリル) エトキシ] カルボニル} グリシル) アミノ] メトキシ} エチル) イノシン

上記工程2で得られた化合物 (15.6 g) のトルエン (46.8 mL) 溶液に上記工程1で得られた化合物 (10.4 g) とピリジン (9.63 mL) を加え、110℃で12時間攪拌した。反応液に上記工程1で得られた化合物 (3.46 g) を追加し、110℃で1日間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液とジクロロメタンを加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン/酢酸エチル] で精製し、標題化合物 (20.6 g : 不純物含有) を得た。

MS (ESI) m/z : 885 (M+H)⁺.

[0399] (工程4)

5' – O – [ビス (4 – メトキシフェニル) (フェニル) メチル] – 1 – (2 – { [(N – { [2 – (トリメチルシリル) エトキシ] カルボニル} グリシル) アミノ] メトキシ} エチル) イノシン

上記工程3で得られた化合物 (20.6 g) のテトラヒドロフラン (50 mL) 溶液にトリエチルアミン三フッ化水素酸塩 (10 mL) を加え、室温で17時間攪拌した。氷冷下、反応液に1M炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液 (50 mL) とトリエチルアミン (10 mL) の混合液をゆっくり加えた後、反応液を減圧濃縮した。残留物をC18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [水/アセトニトリル] で粗精製後、凍結乾燥した。得られた粗

体をピリジンで共沸し、残留物のピリジン（50 mL）溶液に、4, 4' -ジメトキシトリチルクロリド（4.73 g）を0℃で加え、4℃で17時間攪拌した。反応液にメタノール（2 mL）を加え、室温で15分間攪拌後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサン／酢酸エチル／メタノール／0.1%トリエチルアミン〕で精製し、標題化合物（9.18 g：不純物含有）を得た。

MS (ESI) m/z : 845 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 7.94 (1H, s), 7.88 (1H, s), 7.65 (1H, brs), 7.41–7.36 (2H, m), 7.32–7.15 (7H, m), 6.83–6.76 (4H, m), 5.96 (1H, d, J=6.1 Hz), 5.73–5.65 (2H, m), 4.87–4.80 (1H, m), 4.76–4.61 (2H, m), 4.44–4.39 (1H, m), 4.35–4.30 (1H, m), 4.22–4.05 (4H, m), 3.83–3.73 (2H, m), 3.77 (6H, s), 3.72–3.67 (2H, m), 3.48–3.32 (3H, m), 0.99–0.91 (2H, m), 0.02 (9H, s).

[0400] (工程5)

5' -O- [ビス (4-メトキシフェニル) (フェニル) メチル] -3' -O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] -1- (2- { [(N- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] カルボニル} グリシル) アミノ] メトキシ} エチル) イノシン

上記工程4で得られた化合物（5.96 g）を用いて、実施例1工程10と同様の手法で反応を行い、標題化合物（2.33 g）と標題化合物の位置異性体である5' -O- [ビス (4-メトキシフェニル) (フェニル) メチル] -2' -O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] -1- (2- { [(N- { [2- (トリメチルシリル) エトキシ] カルボニル} グリシル) アミノ] メトキシ} エチル) イノシン（2.45 g）を得た。

MS (ESI) m/z : 959 (M+H)⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.99 (1H, s), 7.93 (1H, s), 7.45–7.39 (2H, m), 7.35–7.18 (7H, m), 7.05 (1H, brs), 6.84–6.77 (4H, m), 5.92 (1H, d, $J=5.4\text{ Hz}$), 5.46 (1H, brs), 4.71–4.61 (3H, m), 4.54–4.51 (1H, m), 4.22–4.10 (5H, m), 3.81–3.76 (2H, m), 3.78 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.74 (2H, d, $J=6.0\text{ Hz}$), 3.48 (1H, dd, $J=10.9, 4.2\text{ Hz}$), 3.26 (1H, dd, $J=10.9, 4.2\text{ Hz}$), 3.16 (1H, d, $J=6.7\text{ Hz}$), 1.00–0.93 (2H, m), 0.89 (9H, s), 0.09 (3H, s), 0.02 (9H, s), 0.02 (3H, s).

位置異性体 (2' -O-TBS体)

MS (ESI) m/z : 959 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.99 (1H, s), 7.91 (1H, s), 7.48–7.42 (2H, m), 7.37–7.18 (8H, m), 6.85–6.78 (4H, m), 5.96 (1H, d, $J=5.4\text{ Hz}$), 5.63 (1H, brs), 4.88 (1H, t, $J=5.1\text{ Hz}$), 4.66 (2H, d, $J=6.7\text{ Hz}$), 4.36–4.32 (1H, m), 4.27–4.19 (2H, m), 4.18–4.10 (3H, m), 3.81–3.74 (4H, m), 3.78 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.50 (1H, dd, $J=10.9, 3.6\text{ Hz}$), 3.38 (1H, dd, $J=10.9, 3.6\text{ Hz}$), 2.73 (1H, d, $J=4.2\text{ Hz}$), 0.97–0.90 (2H, m), 0.86 (9H, s), 0.02 (3H, s), 0.01 (9H, s), -0.09 (3H, s).

[0401] (工程6)

5' -O- [ビス (4-メトキシフェニル) (フェニル) メチル] -3' -O- [tert-ブチル (ジメチル) シリル] -2' -O- { (2-シアノエトキシ) [ジ (プロパン-2-イル) アミノ] ホスファニル} -1- (2

ー { [(Nー { [2ー (トリメチルシリル) エトキシ] カルボニル} グリシ
ル) アミノ] メトキシ} エチル) イノシン

[0402] 上記工程5で得られた化合物 (2. 33 g) を用いて、実施例1工程11
と同様の手法で反応を行い、標題化合物 (2. 72 g) をリン原子上のジア
ステレオマー混合物 (ジアステレオマー比=6 : 4) として得た。

MS (ESI) m/z : 1159 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8. 03 (0. 4H, s), 8. 02 (0.
6H, s), 7. 95 (0. 6H, s), 7. 92 (0. 4H, s), 7.
46-7. 40 (2H, m), 7. 35-7. 17 (7H, m), 6. 88
(1H, brs), 6. 84-6. 78 (4H, m), 6. 15 (0. 6H
, d, J=4. 2Hz), 6. 10 (0. 4H, d, J=4. 8Hz), 5.
. 34 (1H, brs), 4. 86-4. 61 (3H, m), 4. 48-4.
. 42 (1H, m), 4. 29-4. 09 (5H, m), 3. 83-3. 4
4 (9H, m), 3. 79 (3H, s), 3. 78 (3H, s), 3. 32
-3. 23 (1H, m), 2. 58-2. 49 (1H, m), 2. 44-2.
. 38 (1H, m), 1. 15 (3. 6H, d, J=6. 7Hz), 1. 1
1 (6H, d, J=6. 7Hz), 1. 04-0. 92 (2H, m), 0.
97 (2. 4H, d, J=6. 7Hz), 0. 85 (3. 6H, s), 0.
84 (5. 4H, s), 0. 09 (1. 2H, s), 0. 06 (1. 8H,
s), 0. 03 (9H, s), 0. 00 (3H, s).

[0403] (工程7)

実施例2工程11で得られた化合物 (2. 15 g) を用いて、実施例1工
程7と同様の手法で反応を行い、6-ベンゾイル-2- {2-デオキシ-2
-フルオロ-3-O- [ヒドロキシ (オキソ) - λ^5 -ホスファニル] - β -
D-リボフラノシル} -6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5
, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレンのアセトニトリル溶液を得た。得
られたアセトニトリル溶液と上記工程6で得られた化合物 (2. 72 g) を
用いて、実施例1工程12と同様の手法で反応を行い、得られた粗生成物を

そのまま次の反応に用いた。

[0404] (工程8)

2-(トリメチルシリル)エチル (2-{[(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-14-(6-ベンゾイル-6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-イル)-16-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-10-(2-シアノエトキシ)-15-フルオロ-2-オキソ-2-スルファニル-10-スルファニリデンオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル]-6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル}エトキシ)メチル]アミノ}-2-オキソエチル)カルバメート

上記工程7で得られた粗生成物を用いて、実施例1工程13と同様の手法で反応を行い、標題化合物(1.47g:不純物含有)をリン原子上のジアステレオマー混合物として得た。

MS (ESI) m/z: 1278 (M+H)⁺.

[0405] (工程9)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-16-{[tert-ブチル(ジメチル)シリル]オキシ}-15-フルオロ-2, 10-ジオキソ-7-[6-オキソ-1-(2-{[(N-{[2-(トリメチルシリル)エトキシ]カルボニル}グリシル)アミノ]メトキシ}エチル)-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル]-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-イル)オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス(チオラート)

上記工程 8 で得られた化合物 (1.47 g) のメタノール (10 mL) - テトラヒドロフラン (10 mL) 混合溶液に、28%アンモニア水 (10 mL) を加え、50℃で6時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残留物を C18 シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] で精製し、標題化合物のジアステレオマー 1 (204 mg : 不純物含有) とジアステレオマー 2 (205 mg : 不純物含有) を得た。

ジアステレオマー 1 (低極性)

MS (ESI) m/z : 1121 (M+H)⁺.

ジアステレオマー 2 (高極性)

MS (ESI) m/z : 1121 (M+H)⁺.

[0406] (工程 10-1)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) - 15-フルオロ-7- (1- {2- [(グリシルアミノ) メトキシ] エチル} -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-プリン-9-イル) -16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-14- (6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-2, 10-ビス (チオラート)

上記工程 9 で得られた化合物 (ジアステレオマー 1) (204 mg) のテトラヒドロフラン (6 mL) 溶液に、フッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液 (約 1 M, 3 mL) を加え、室温で 33 時間攪拌した。4℃で3日間保存した後、反応液に 10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液を加え、C18 シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル] と分取 HPLC [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル-メタノール溶液 (

1 : 1) , アセトニトリル-メタノール溶液 (1 : 1) : 1 0 % - 5 0 % (0 分 - 4 0 分)] で精製し、標題化合物 (4 0 . 7 m g : 不純物含有) を得た。

MS (ESI) m / z : 8 6 3 (M + H) ⁺.

[0407] (工程 1 0 - 2)

ビス (N , N - ジエチルエタンアミニウム) (5 R , 7 R , 8 R , 1 2 a R , 1 4 R , 1 5 R , 1 5 a R , 1 6 R) - 1 5 - フルオロ - 7 - (1 - { 2 - [(グリシルアミノ) メトキシ] エチル } - 6 - オキソ - 1 , 6 - ジヒドロ - 9 H - プリン - 9 - イル) - 1 6 - ヒドロキシ - 2 , 1 0 - ジオキソ - 1 4 - (6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 2 H - 2 , 3 , 5 , 6 - テトラアザベンゾ [c d] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2 H , 1 0 H , 1 2 H - 5 , 8 - メタノ - 2 λ ⁵ , 1 0 λ ⁵ - フロ [3 , 2 - I] [1 , 3 , 6 , 9 , 1 1 , 2 , 1 0] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2 , 1 0 - ビス (チオラート)

[0408] 上記工程 9 で得られた化合物 (ジアステレオマー 2) (2 0 5 m g) を用いて、上記工程 1 0 - 1 と同様の手法で反応を行った後、C 1 8 シリカゲルカラムクロマトグラフィー [1 0 m M 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液 / アセトニトリル] と分取 HPLC [1 0 m M 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液 / アセトニトリル-メタノール溶液 (1 : 1) , アセトニトリル-メタノール溶液 (1 : 1) : 1 0 % - 5 0 % (0 分 - 4 0 分)] で精製し、標題化合物 (5 0 . 8 m g : 不純物含有) を得た。

MS (ESI) m / z : 8 6 3 (M + H) ⁺.

[0409] (工程 1 1 - 1)

ビス (N , N - ジエチルエタンアミニウム) N - [4 - (1 1 , 1 2 - ジデヒドロジベンゾ [b , f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - フェニルアラニル - N - [(2 - { 9 - [(5 R , 7 R , 8 R , 1 2 a R , 1 4 R , 1 5 R , 1 5 a R , 1 6 R) - 1 5 - フルオロ - 1 6 - ヒドロキシ - 2 , 1 0 - ジオキソ - 2 , 1 0 - ジス

ルフィド-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-
 -テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 1
 0H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1
 , 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシ
 ン-7-イル] -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル
 } エトキシ) メチル] グリシンアミド

(薬物リンカー17a : ジアステレオマー1)

[0410] 上記工程10-1で得られた化合物(40.7mg)のN, N-ジメチル
 ホルムアミド(0.5mL)溶液にトリエチルアミン(11μL)と実施例
 5工程8で得られた化合物(25.4mg)を加え、室温で2時間攪拌した。
 反応液にベンジルアミン(8μL)を加え、室温で1時間攪拌した。10
 mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液とメタノールを加え、C18シリカ
 ゲルカラムクロマトグラフィー[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶
 液/アセトニトリル]、分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウ
 ム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル:20%-45%(0分-40
 分)]、及び分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/
 メタノール, メタノール:40%-90%(0分-40分)]で精製し、標
 題化合物(25.1mg)を得た。

MS (ESI) m/z : 1411 (M+H)⁺.

¹H-NMR (CD₃OD) δ : 8.58 (1H, s), 8.09 (1H, s),
 8.04 (1H, s), 7.57-7.49 (2H, m), 7.43-
 7.34 (3H, m), 7.32-7.08 (9H, m), 6.47 (1H,
 d, J=16.9Hz), 6.23 (1H, d, J=7.9Hz), 5.
 56-5.37 (2H, m), 5.31-5.17 (1H, m), 5.03
 (1H, d, J=13.9Hz), 4.79 (1H, d, J=4.2Hz),
 4.64-4.38 (6H, m), 4.36-4.21 (4H, m), 4.
 05-3.60 (10H, m), 3.53-3.42 (3H, m), 3.
 18 (12H, q, J=7.3Hz), 3.01-2.92 (1H, m),

2.86–2.73 (1H, m), 2.70–2.54 (2H, m), 2.37–2.16 (2H, m), 2.06–1.77 (3H, m), 1.28 (18H, t, J = 7.3 Hz).

[0411] (工程11–2)

ビス(N, N-ジエチルエタンアミニウム) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィド-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ[c,d]アズレン-2-イル)オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ[3, 2-1][1, 3, 6, 9, 11, 2, 10]ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル)-6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル}エトキシ)メチル]グリシンアミド

(薬物リンカー17b: ジアステレオマー2)

[0412] 上記工程10–2で得られた化合物(50.8mg)と実施例5工程8で得られた化合物(31.7mg)を用いて、上記工程11–1と同様の手法で反応を行った後、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル]、分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 25%–45%(0分–40分)]、及び分取HPLC[10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/メタノール, メタノール: 45%–90%(0分–40分)]で精製し、標題化合物(23.4mg)を得た。

MS (ESI) m/z: 1411 (M+H)⁺.

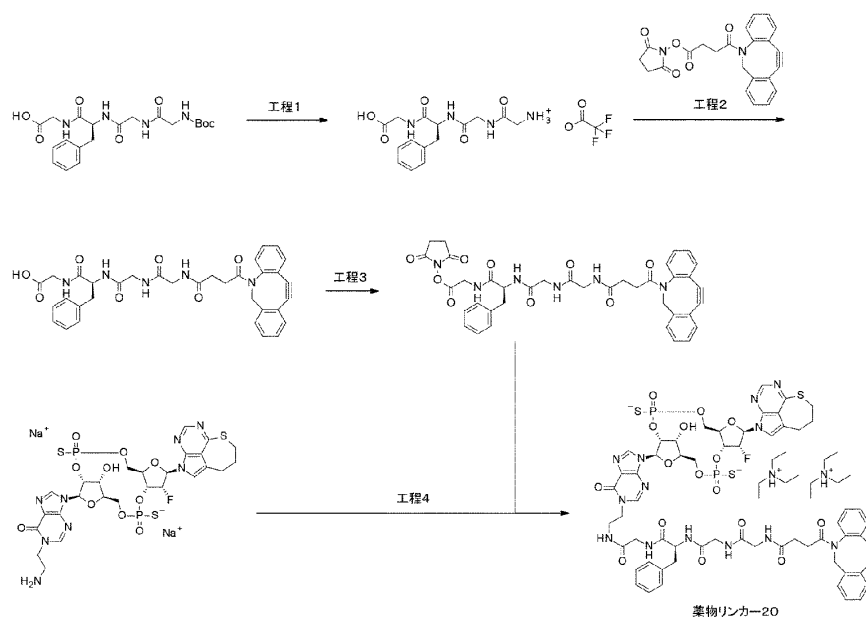
¹H-NMR (CD₃OD) δ: 8.67 (1H, s), 8.14 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.67–7.50 (2H, m), 7.43–7.36 (3H, m), 7.34–7.12 (9H, m), 6.48 (1H

, d, $J = 15.1 \text{ Hz}$), 6.26 (1H, t, $J = 8.8 \text{ Hz}$), 5.60–5.31 (3H, m), 5.09–5.00 (1H, m), 4.61–4.22 (9H, m), 4.11–3.59 (13H, m), 3.50–3.44 (2H, m), 3.18 (12H, q, $J = 7.3 \text{ Hz}$), 3.04–2.93 (1H, m), 2.87–2.74 (3H, m), 2.39–2.22 (2H, m), 2.06–1.85 (3H, m), 1.28 (18H, t, $J = 7.3 \text{ Hz}$).

[0413] 実施例7：薬物リンカー20の合成

[合成スキーム]

[0414] [化103]



[0415] (工程1)

N-(アザニウミルアセチル)グリシル-L-フェニルアラニルグリシントリフルオロアセレート

市販 (BACHEM) のN-(tert-ブトキシカルボニル)グリシルグリシル-L-フェニルアラニルグリシン (3.00 g) のジクロロメタン (30 mL) 溶液に室温でトリフルオロ酢酸 (15 mL) を加え、同温度で

3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、トルエンに懸濁させて再度減圧濃縮した。この濃縮操作をさらに2回繰り返した。残留物をジエチルエーテル（100 mL）でスラリー状にした後、濾取し、標題化合物（3.27 g）の粗体を得た。

MS (ESI) m/z : 337 (M+H)⁺.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 12.60 (1H, brs), 8.48 (1H, t, J=5.6 Hz), 8.44 (1H, t, J=5.9 Hz), 8.31 (1H, d, J=8.8 Hz), 7.97 (3H, brs), 7.28–7.16 (5H, m), 4.58 (1H, m), 3.87 (1H, dd, J=16.8, 5.6 Hz), 3.78 (2H, d, J=5.9 Hz), 3.67 (1H, dd, J=17.1, 5.4 Hz), 3.56 (2H, brd, J=4.4 Hz), 3.05 (1H, dd, J=13.7, 3.9 Hz), 2.74 (1H, dd, J=13.7, 10.3 Hz).

[0416] (工程2)

N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニアラニルグリシン

上記工程1で得られた化合物（2.09 g）のN,N-ジメチルホルミアミド（46.4 mL）溶液にトリエチルアミン（0.804 mL）と1-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H)-イル)-4-オキソブタノイル] オキシ} ピロリジン-2, 5-ジオン（1.87 g）を加え、室温で21時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ジクロロメタン/メタノール] で精製した。得られた化合物のジクロロメタン溶液にジエチルエーテルを加えてスラリー状にした後、濾取し、標題化合物（2.10 g）を得た。

MS (ESI) m/z : 624 (M+H)⁺.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ : 8.20–7.91 (4H, m), 7.68–7.13 (13H, m), 4.98 (1H, dd, J=13.9, 3

. 2 Hz), 4.51–4.46 (1 H, m), 3.73–3.47 (7 H, m), 3.00 (1 H, dd, $J=13.9, 4.1$ Hz), 2.73 (1 H, t, $J=11.7$ Hz), 2.67–2.57 (1 H, m), 2.29–2.22 (1 H, m), 2.06–2.01 (1 H, m), 1.80–1.73 (1 H, m). (観測可能なピークのみ記載)

[0417] (工程3)

2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル-N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニルグリシナート

上記工程2で得られた化合物(2.10 g)のN, N-ジメチルホルミアミド(33.7 mL)溶液にN-ヒドロキシスクシンイミド(426 mg)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(710 mg)を加え、窒素雰囲気下、室温で16時間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈後、氷水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。油状の残留物に酢酸エチルを加えて固体を析出させた。溶媒を減圧下で留去、得られた固体にジエチルエーテルを加えてスラリー状にした後、濾取し、標題化合物(2.18 g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 8.74–8.69 (1 H, m), 8.16–8.08 (2 H, m), 8.00–7.93 (1 H, m), 7.71–7.15 (13 H, m), 5.00 (1 H, dd, $J=13.9, 3.0$ Hz), 4.55–4.49 (1 H, m), 4.27 (2 H, t, $J=6.0$ Hz), 3.77–3.68 (1 H, m), 3.64–3.50 (4 H, m), 3.02 (1 H, dd, $J=13.9, 4.2$ Hz), 2.82–2.73 (5 H, m), 2.69–2.58 (1 H, m), 2.33–2.24 (1 H, m), 2.10–2.02 (1 H, m), 1.83–1.75 (1 H, m).

[0418] (工程4)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N- [4- (11, 12-ジ
 デヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブ
 タノイル] グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N- (2- {9- [
 (5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -1
 4- (8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [cd]
 アズレン-2 (7H) -イル) -15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2,
 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィドオクタヒドロ-2H, 10H, 1
 2H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6
 , 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-
 イル] -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エチル
) グリシンアミド
 (薬物リンカー20)

[0419] 実施例3工程23-2で得られた化合物 (25.0mg) のN, N-ジメ
 チルホルムアミド (0.5mL) 溶液にトリエチルアミン (8μL) と上記
 工程3で得られた化合物 (25.8mg) を加え、室温で2時間攪拌した。
 反応液に、ベンジルアミン (7μL) を加え、室温で1時間攪拌した。反応
 液に10mM酢酸トリエチルアンモニウム水溶液とメタノールを加え、C1
 8シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10mM酢酸トリエチルアンモニ
 ウム水溶液/アセトニトリル]、分取HPLC [10mM酢酸トリエチルア
 ンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 30%-50% (0
 分-40分)]、及び分取HPLC [10mM酢酸トリエチルアンモニウム
 水溶液/メタノール, メタノール: 50%-90% (0分-40分)] で精
 製し、標題化合物 (33.1mg) を得た。

MS (ESI) m/z: 1398 (M+H)⁺.

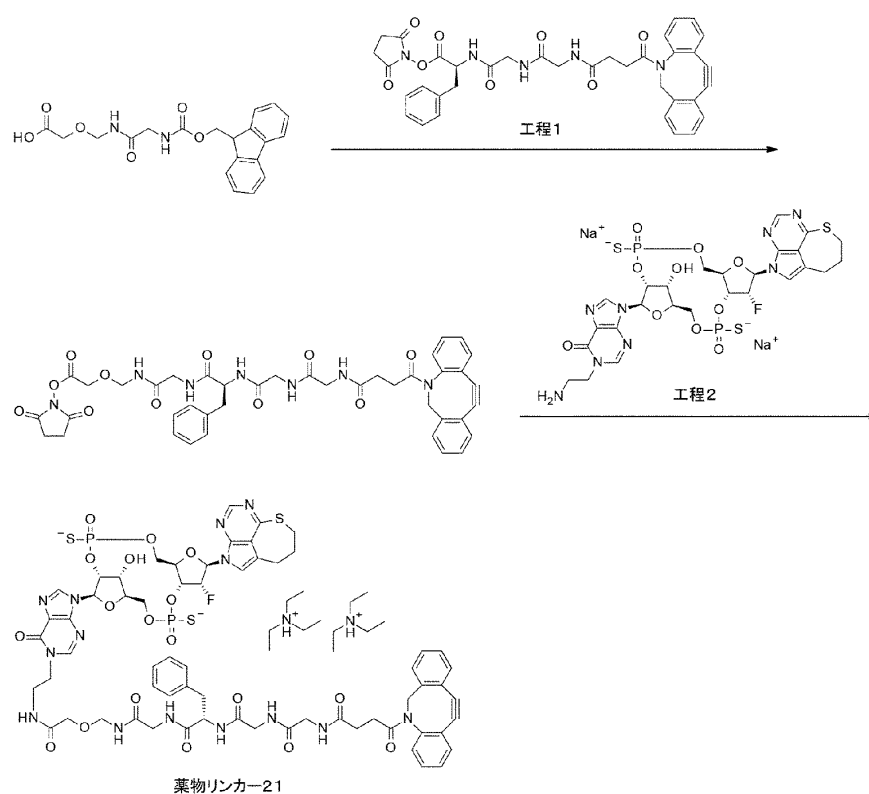
¹H-NMR (CD₃OD) δ: 8.58 (1H, brs), 8.39 (1H
 , d, J=8.5Hz), 8.00 (1H, brs), 7.71 (1H, brs), 7.64-7.49 (2H, m), 7.44-7.37 (3H, m
), 7.32-7.10 (8H, m), 6.59 (1H, d, J=15.1

H z), 6.23 (1H, d, J=8.5 Hz), 5.65–5.36 (3H, m), 5.03 (1H, dd, J=16.6, 14.2 Hz), 4.57–4.38 (5H, m), 4.30–4.17 (2H, m), 4.07–3.95 (2H, m), 3.94–3.50 (9H, m), 3.50–3.35 (1H, m), , 3.19 (12H, q, J=7.3 Hz), 3.18–3.07 (3H, m), 3.04–2.73 (4H, m), 2.40–2.11 (4H, m), 2.05–1.92 (1H, m), 1.29 (18H, t, J=7.3 Hz).

[0420] 実施例8：薬物リンカー21の合成

[合成スキーム]

[0421] [化104]



[0422] (工程1)

N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6

H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニアラニル-N- ({2- [(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル) オキシ] -2-オキソエトキシ} メチル) グリシンアミド

文献既知 (WO 2014/057687) の { [(N- { [(9H-フルオレン-9-イル) メトキシ] カルボニル} グリシル) アミノ] メトキシ} 酢酸 (955 mg) のN, N-ジメチルホルムアミド (8.0 mL) 溶液に、1, 8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-ウンデセン (0.74 mL) を加え、室温で1時間攪拌した (反応液A)。実施例5工程7で得られた化合物 (938 mg) のN, N-ジメチルホルムアミド (8.0 mL) 溶液にN-ヒドロキシスクシンイミド (229 mg) と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (380 mg) を加え、室温で50分間攪拌した (反応液B)。反応液Aを反応液Bに加え、室温で1時間攪拌した。反応液にジクロロメタン (50 mL) と10%クエン酸水溶液 (10 mL) を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム / (クロロホルム / メタノール / 水 = 7 : 3 : 1 の下層)] で精製した。得られた化合物のN, N-ジメチルホルムアミド (8.0 mL) 溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド (229 mg) と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (380 mg) を加え、室温で30分間攪拌した。反応液にジクロロメタン (100 mL) と水 (25 mL) を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム / メタノール] で精製した。目的物を含むフラクションを減圧濃縮し、残留物にジエチルエーテルを加えてスラリー状にした。得られた固体を濾取し、標題化合物 (412 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 8.72 (1H, m), 8.32 (1H

, m), 8.17–7.96 (3H, m), 7.71–7.15 (13H, m), 5.01 (1H, d, J=13.9 Hz), 4.70–4.48 (5H, m), 3.81–3.51 (7H, m), 3.05 (1H, dd, J=14.2, 3.9 Hz), 2.83 (4H, s), 2.80 (1H, m), 2.64 (1H, m), 2.28 (1H, m), 2.07 (1H, m), 1.79 (1H, m).

[0423] (工程2)

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル)-4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-({2-[(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-14-(8, 9-ジヒドロ-6-チア-2, 3, 5-トリアザベンゾ [c d] アズレン-2 (7H) -イル)-15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィドオクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル]-6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エチル) アミノ]-2-オキソエトキシ} メチル) グリシンアミド (薬物リンカー21)

[0424] 実施例3工程23-2で得られた化合物 (15.0 mg) と上記工程1で得られた化合物 (17.4 mg) を用いて、実施例7工程4と同様の手法で反応を行った後、C18シリカゲルカラムクロマトグラフィー [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル]、分取HPLC [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/アセトニトリル, アセトニトリル: 25%–50% (0分–40分)]、及び分取HPLC [10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム水溶液/メタノール, メタノール: 40%–90% (0分–40分)] で精製し、標題化合物 (21.8 mg) を得た。
MS (ESI) m/z: 1485 (M+H)⁺.

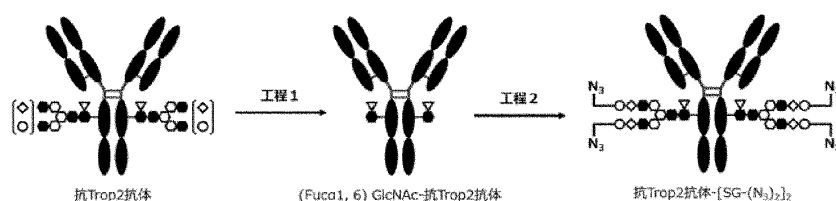
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 8.61 (1H, brs), 8.41–8.34 (1H, m), 8.10–8.05 (1H, m), 7.72–7.37 (6H, m), 7.32–7.12 (8H, m), 6.63–6.50 (1H, m), 6.27–6.22 (1H, m), 5.65–5.31 (3H, m), 5.07–4.94 (1H, m), 4.68–4.20 (10H, m), 4.11–3.53 (14H, m), 3.26–3.08 (2H, m), 3.19 (12H, q, $J=7.3\text{ Hz}$), 3.06–2.67 (4H, m), 2.40–2.11 (4H, m), 2.05–1.88 (1H, m), 1.29 (18H, t, $J=7.3\text{ Hz}$).

[0425] 実施例9：糖鎖リモデリング抗体1の合成

抗Trop2抗体1-[SG-(N₃)₂]₂の調製

[0426] [合成スキーム]

[化105]



[0427] (工程1)

(Fucα1,6)GlcNAc-抗Trop2抗体1の調製

参考例5に従って調製した抗Trop2抗体1のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (6.0 mL, 16.55 mg/mL, pH 6.0) に、野生型EndoSのリン酸緩衝生理食塩水溶液 (0.064 mL, 7.70 mg/mL, pH 6.0) を加え、37℃で2時間振盪した。反応の進行具合をExperion電気泳動ステーション (BIO-RAD製) で確認した。反応終了後、以下の方法に従い、アフィニティークロマトグラフィーによる精製とヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。

(1) アフィニティークロマトグラフィーによる精製

精製装置：AKTA avant 25 (GE ヘルスケア製)

カラム：HiTrap rProtein A FF (5 mL) (GE ヘルスケア製)

流速：5 mL/min (チャージ時は1.25 mL/min)

カラムへの結合時には、反応液を直接カラムに添加し、結合バッファー [20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)] を1.25 mL/min で2 CV (Column Volume) 流し、更に5 mL/min で5 CV 流した。中間洗浄時には、洗浄溶液 [20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), 0.5 M 塩化ナトリウム溶液] を15 CV 流した。溶出時には、溶出バッファー (ImmunoPure IgG Elution buffer、PIERC E 製) を6 CV 流した。溶出液を1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) で直ちに中和した。目的物を含むフラクションを共通操作Cに記載の方法に従い、5 mM リン酸緩衝液, 50 mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 溶液 (pH 6.8) への緩衝液交換を行った。得られた緩衝液の抗体濃度を共通操作Bに記載の方法に従って測定し、粗精製された標題抗体溶液 (12.38 mg/mL, 8 mL) を得た。

(2) ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製

精製装置：AKTA avant 25 (GE ヘルスケア製)

カラム：Bio-Scale Mini CHT Type I カートリッジ (5 mL) (BIO-RAD 製)

流速：5 mL/min (チャージ時は1.25 mL/min)

[0428] 上記(1)で得られた溶液をカラムへ添加し、A液 [5 mM リン酸緩衝液, 50 mM MES 溶液 (pH 6.8)] を1.25 mL/min で2 CV 流し、更に5 mL/min で3 CV 流した。その後、A液とB液 [5 mM リン酸緩衝液, 50 mM MES 溶液 (pH 6.8)、2 M 塩化ナトリウム溶液] を用いて、溶出した。溶出条件は、A液 : B液 = 100 : 0 ~ 0 : 100 (5 CV) である。さらに、洗浄溶液 [500 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5)] を5 CV 流した。目的物を含むフラクションを共通操作Cに記載の方

法に従い、20 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）への緩衝液交換を行った。
得られた緩衝液の抗体濃度を共通操作Bに記載の方法に従って測定し、標題
抗体溶液（12.30 mg/mL, 8 mL）を得た。

[0429]（工程2）

抗Trop2抗体1- $[\text{SG}-(\text{N}_3)_2]_2$ の調製

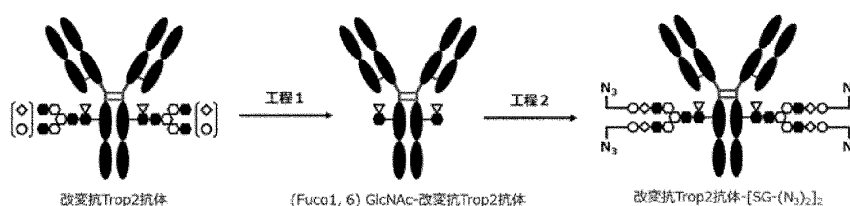
上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝液（12.30 mg/mL, 8 mL, pH 6.0）に $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG}(10)\text{Ox}$ （WO2018/003983の化合物1-10）（22.7 mg）とEndo S（D233Q/Q303L）のリン酸緩衝生理食塩水溶液（0.339 mL, 5.8 mg/mL, pH 6.0）を加え、30℃で4.5時間振盪した。反応の進行具合をExperion電気泳動ステーション（BIO-RAD製）で確認した。反応終了後、上記工程1と同様にアフィニティークロマトグラフィーによる精製とハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製を行った。目的物を含むフラクションを共通操作Cに記載の方法に従って、リン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）への緩衝液交換を行った。得られた緩衝液の抗体濃度を共通操作Bに記載の方法に従って測定し、標題抗体溶液（10.24 mg/mL, 9 mL）を得た。

[0430] 実施例10：糖鎖リモデリング抗体2の合成

改変抗Trop2抗体- $[\text{SG}-(\text{N}_3)_2]_2$ の調製

[合成スキーム]

[化106]



[0431]（工程1）

(Fuc α 1, 6) GlcNAc-改変抗Trop2抗体の調製

参考例6に従って調製した改変抗Trop2抗体のリン酸緩衝生理食塩水

溶液（10 mL，16.75 mg/mL，pH 6.0）を用いて、実施例9工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20 mMリン酸緩衝液（18.11 mg/mL，7.5 mL，pH 6.0）を得た。

[0432]（工程2）

改変抗Trop2抗体－[SG－(N₃)₂]₂の調製

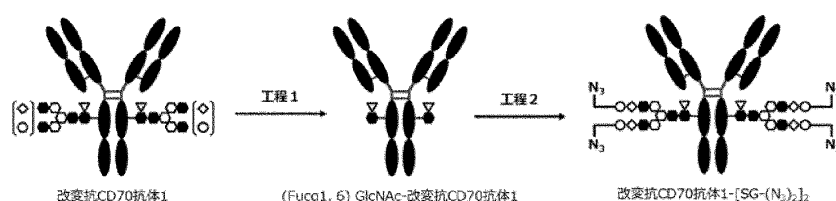
上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝液（18.11 mg/mL，7.5 mL，pH 6.0）と[N₃－PEG(3)]₂－SG(10)Ox(32 mg)を用いて、実施例9工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（11.03 mg/mL，10.5 mL，pH 6.0）を得た。

[0433] 実施例11：糖鎖リモデリング抗体3の合成

改変抗CD70抗体1－[SG－(N₃)₂]₂の調製

[0434] [合成スキーム]

[化107]



（工程1）

(Fucα1, 6) GlcNAc－改変抗CD70抗体1の調製

参考例3に従って調製した改変抗CD70抗体1のリン酸緩衝生理食塩水溶液（3.0 mL，16.11 mg/mL，pH 6.0）を用いて、実施例9工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20 mMリン酸緩衝液（6.41 mg/mL，5.5 mL，pH 6.0）を得た。

[0435]（工程2）

改変抗CD70抗体1－[SG－(N₃)₂]₂の調製

上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝液（6.41 mg/mL，5.5 mL，pH 6.0）と[N₃－PEG(3)]₂－SG(10)Ox

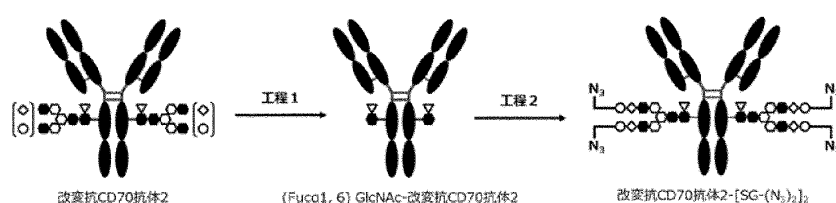
(10 mg) を用いて、実施例 9 工程 2 と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (9.24 mg/mL, 3.25 mL, pH 6.0) を得た。

[0436] 実施例 12：糖鎖リモデリング抗体 4 の合成

改変抗 CD70 抗体 2 - [SG-(N₃)₂]₂ の調製

[0437] [合成スキーム]

[化108]



[0438] (工程 1)

(Fucα1, 6) GlcNAc-改変抗 CD70 抗体 2 の調製

参考例 4 に従って調製した改変抗 CD70 抗体 2 のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (10.0 mL, 14.00 mg/mL, pH 6.0) を用いて、実施例 9 工程 1 と同様の操作を行い、標題抗体の 20 mM リン酸緩衝液 (18.67 mg/mL, 6 mL, pH 6.0) を得た。

[0439] (工程 2)

改変抗 CD70 抗体 2 - [SG-(N₃)₂]₂ の調製

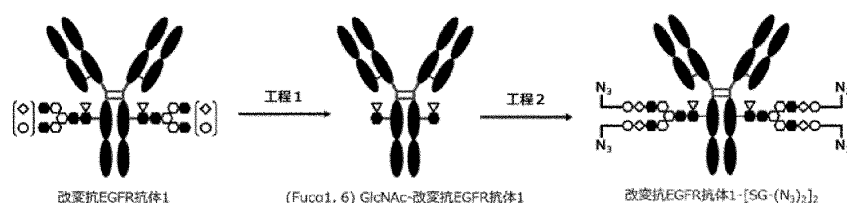
上記工程 1 で得られた抗体の 20 mM リン酸緩衝液 (18.67 mg/mL, 6 mL, pH 6.0) と [N₃-PEG(3)]₂-SG(10) Ox (26 mg) を用いて、実施例 9 工程 2 と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (11.39 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0) を得た。

[0440] 実施例 13：糖鎖リモデリング抗体 5 の合成

改変抗 EGFR 抗体 1 - [SG-(N₃)₂]₂ の調製

[0441] [合成スキーム]

[化109]



[0442] (工程1)

(Fuca1, 6) GlcNAc-改変抗EGFR抗体1の調製

参考例7に従って調製した改変抗EGFR抗体1のリン酸緩衝生理食塩水溶液(10.0 mL, 14.00 mg/mL, pH 6.0)を用いて、実施例9工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20 mMリン酸緩衝液(16.70 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0)を得た。

[0443] (工程2)

改変抗EGFR抗体1-[SG-(N₃)₂]₂の調製

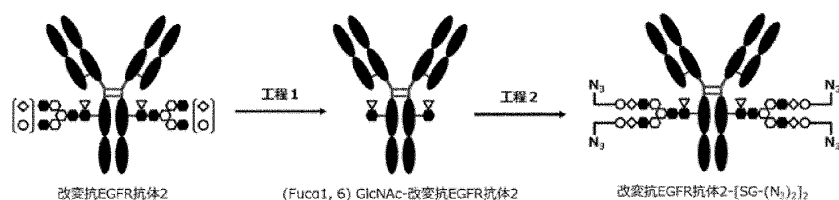
上記工程1で得られた抗体の20 mMリン酸緩衝液(16.70 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0)と[N₃-PEG(3)]₂-SG(10) O×(29 mg)を用いて、実施例9工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(10.49 mg/mL, 10 mL, pH 6.0)を得た。

[0444] 実施例14：糖鎖リモデリング抗体6の合成

改変抗EGFR抗体2-[SG-(N₃)₂]₂の調製

[0445] [合成スキーム]

[化110]



[0446] (工程1)

(Fuc α 1, 6)GlcNAc-改変抗EGFR抗体2の調製

参考例8に従って調製した改変抗EGFR抗体2のリン酸緩衝生理食塩水溶液(10.0mL, 14.10mg/mL, pH6.0)を用いて、実施例9工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝液(16.88mg/mL, 6mL, pH6.0)を得た。

[0447] (工程2)

改変抗EGFE抗体2-[SG-(N₃)₂]₂の調製

上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝液(16.88mg/mL, 6mL, pH6.0)と[N₃-PEG(3)]₂-SG(10)Ox(23mg)を用いて、実施例9工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液(8.34mg/mL, 6.75mL, pH6.0)を得た。

[0448] 実施例15: 抗体薬物コンジュゲート1の合成(抗Trop2抗体1-CDNコンジュゲート(1)の合成)

糖鎖リモデリング抗体1のリン酸緩衝生理食塩水(pH6.0)溶液(10.24mg/mL, 0.500mL)をプロピレングリコール(0.250mL)で希釈した。この溶液に薬物リンカー2bのジメチルスルホキシド溶液(10mM, 0.085mL, 抗体1分子に対して24当量)とプロピレングリコール(0.165mL)の混合液を加え、チューブローテーター(MTR-103, アズワン株式会社)を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液(3.5mL)を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度: 0.89mg/mL

抗体収量: 3.12mg (62%)

薬物平均結合数: 3.7

[0449] 実施例16: 抗体薬物コンジュゲート2の合成(抗Trop2抗体2-CDNコンジュゲート(1)の合成)

糖鎖リモデリング抗体2のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（11.03 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.061 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.439 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.26 mg/mL

抗体収量：8.16 mg（74%）

薬物平均結合数：3.5

[0450] 実施例17：抗体薬物コンジュゲート3の合成（抗Trop2抗体2-CDNコンジュゲート（2）の合成）

糖鎖リモデリング抗体2のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（11.03 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー20のジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.061 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.439 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.30 mg/mL

抗体収量：8.45 mg（77%）

薬物平均結合数：3.5

[0451] 実施例18：抗体薬物コンジュゲート4の合成（抗Trop2抗体2-CDNコンジュゲート（3）の合成）

糖鎖リモデリング抗体2のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（11.03 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー21のジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.061 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.439 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.33 mg/mL

抗体収量：8.62 mg（78%）

薬物平均結合数：3.6

[0452] 実施例19：抗体薬物コンジュゲート5の合成（抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート（1）の合成）

糖鎖リモデリング抗体3のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（9.24 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.051 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.449 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.08 mg/mL

抗体収量：7.02 mg（76%）

薬物平均結合数：3.8

[0453] 実施例20：抗体薬物コンジュゲート6の合成（抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（1）の合成）

糖鎖リモデリング抗体4のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（11.39 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.063 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.437 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.33 mg/mL

抗体収量：8.65 mg（76%）

薬物平均結合数：3.7

[0454] 実施例21：抗体薬物コンジュゲート7の合成（抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（1）の合成）

糖鎖リモデリング抗体5のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（0.49 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.058 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.442 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（7.0 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：0.69 mg/mL

抗体収量：4.84 mg（48%）

薬物平均結合数：3.6

[0455] 実施例22：抗体薬物コンジュゲート8の合成（抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート（1）の合成）

糖鎖リモデリング抗体6のリン酸緩衝生理食塩水（pH 6.0）溶液（8.34 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.055 mL, 抗体1分子に対して9.6当量）とプロピレングリコール（0.445 mL）の混合液を加え、チューブローテーター（MTR-103, アズワン株式会社）を用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（7.0 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：0.52 mg/mL

抗体収量：3.62 mg（43%）

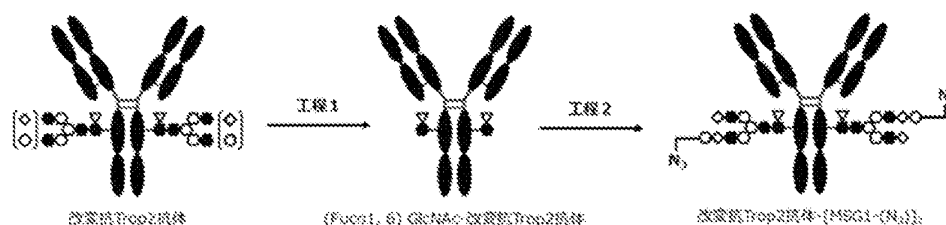
薬物平均結合数：3.8

[0456] 実施例23：糖鎖リモデリング抗体7の合成

改変抗Trop2抗体-[MSG1-(N₃)]₂の調製

[0457] [合成スキーム]

[化111]



[0458] (工程1)

(Fucα1,6)GlcNAc-改変抗Trop2抗体の調製

改変抗Trop2抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（5 mL, 16.75 mg/mL, pH 6.0）を用いて、実施例9工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20 mMリン酸緩衝液（9.81 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0）を得た。

[0459] (工程2)

改変抗Trop2抗体－[MSG1－(N₃)]₂の調製

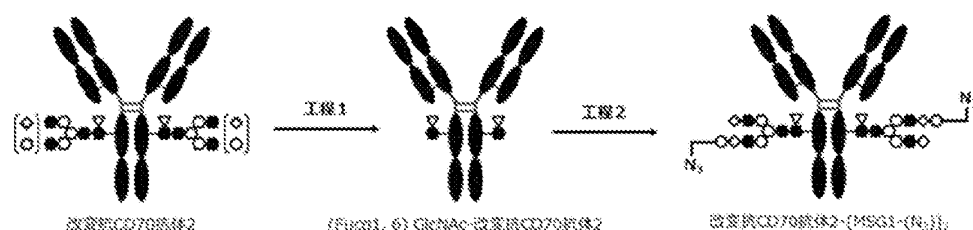
上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝液（9.81mg/mL，7.5mL，pH6.0）と[N₃－PEG（3）]－MSG1（9）Ox（WO2018/003983の化合物1－11）（12mg）を用いて、実施例9工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（13.22mg/mL，5mL，pH6.0）を得た。

[0460] 実施例24：糖鎖リモデリング抗体8の合成

改変抗CD70抗体2－[MSG1－(N₃)]₂の調製

[0461] [合成スキーム]

[化112]



[0462] (工程1)

(Fucα1, 6) GlcNAc－改変抗CD70抗体2の調製

改変抗CD70抗体2のリン酸緩衝生理食塩水溶液（1.6mL，13.44mg/mL，pH6.0）を用いて、実施例9工程1と同様の操作を行い、標題抗体の20mMリン酸緩衝液（8.96mg/mL，2mL，pH6.0）を得た。

[0463] (工程2)

改変抗CD70抗体2－[MSG1－(N₃)]₂の調製

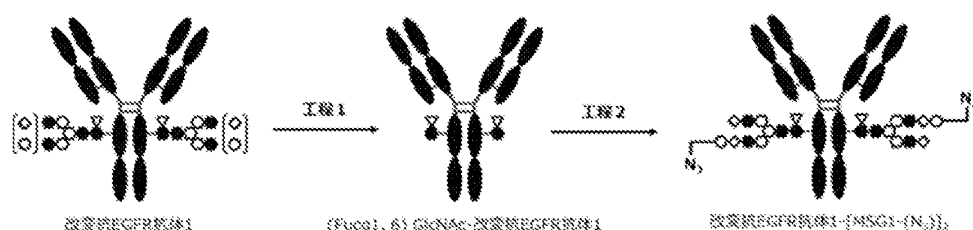
上記工程1で得られた抗体の20mMリン酸緩衝液（8.96mg/mL，2mL，pH6.0）と[N₃－PEG（3）]－MSG1（9）Ox（4mg）を用いて、実施例9工程2と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液（12.20mg/mL，1.2mL，pH6.0）を得た。

[0464] 実施例 25：糖鎖リモデリング抗体 9 の合成

改変抗 E G F R 抗体 1 - [MSG1 - (N₃)]₂ の調製

[0465] [合成スキーム]

[化113]



[0466] (工程 1)

(Fucα1, 6) GlcNAc-改変抗 E G F R 抗体 1 の調製

改変抗 E G F R 抗体 1 のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (10 mL, 14.0 mg/mL, pH 6.0) を用いて、実施例 9 工程 1 と同様の操作を行い、標題抗体の 20 mM リン酸緩衝液 (14.51 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0) を得た。

[0467] (工程 2)

改変抗 E G F R 抗体 1 - [MSG1 - (N₃)]₂ の調製

上記工程 1 で得られた抗体の 20 mM リン酸緩衝液 (14.51 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0) と [N₃-PEG (3)]-MSG1 (9) O × (17.3 mg) を用いて、実施例 9 工程 2 と同様の操作を行い、標題抗体のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (13.34 mg/mL, 7.5 mL, pH 6.0) を得た。

[0468] 実施例 26：抗体薬物コンジュゲート 9 の合成 (抗 T r o p 2 抗体 2 - C D N コンジュゲート (4) の合成)

糖鎖リモデリング抗体 7 のリン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.0) 溶液 (13.22 mg/mL, 1.00 mL) をプロピレングリコール (0.500 mL) で希釈した。この溶液に薬物リンカー 17 a のジメチルスルホキシド溶液 (10 mM, 0.073 mL, 抗体 1 分子に対して 8 当量) とプロピレ

ングリコール（0.427 mL）の混合液を加え、チューブローターを用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.36 mg/mL

抗体収量：8.83 mg（67%）

薬物平均結合数：1.9

[0469] 実施例27：抗体薬物コンジュゲート10の合成（抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（2）の合成）

糖鎖リモデリング抗体8のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）溶液（12.20 mg/mL, 1.20 mL）をプロピレングリコール（0.600 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.081 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレングリコール（0.519 mL）の混合液を加え、チューブローターを用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（7 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.46 mg/mL

抗体収量：10.25 mg（70%）

薬物平均結合数：1.9

[0470] 実施例28：抗体薬物コンジュゲート11の合成（抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（2）の合成）

糖鎖リモデリング抗体9のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.0）溶液（13.34 mg/mL, 1.00 mL）をプロピレングリコール（0.500 mL）で希釈した。この溶液に薬物リンカー17aのジメチルスルホキシド溶液（10 mM, 0.074 mL, 抗体1分子に対して8当量）とプロピレ

ングリコール（0.426 mL）の混合液を加え、チューブローテーターを用いて室温で2日間反応させた。反応液を共通操作Dに記載の方法に従って精製し、目的とする抗体薬物コンジュゲートのABS溶液（6.5 mL）を得た。

共通操作E及びGに記載の方法に従って分析し、下記の結果を得た。

抗体濃度：1.68 mg/mL

抗体収量：10.91 mg（82%）

薬物平均結合数：1.9

[0471]（参考例1：ML-RR-CDA・2Na⁺の合成）

本明細書で、リファレンス化合物として使用したML-RR-CDA・2Na⁺は、特許文献3（WO2014/189805）に記載された方法に従って合成した。

（参考例2：2', 3'-cGAMPの合成）

[0472] 本明細書で、リファレンス化合物として使用した2', 3'-cGAMPは、cGASを用いてATPとGTPから酵素的に合成した。cGASの調製及び酵素反応は、文献記載の方法（Immunity, 2013, 39, 1019-1031、Cell Rep. 2014, 6, 421-430）を適宜改変して実施した。精製は、弱塩基性陰イオン交換樹脂（DIAION WA10）及び合成吸着剤（SEPABEADS SP207SS）を用いたカラムクロマトグラフィーにより実施した。

[0473]（参考例3：抗CD70抗体1の作製）

抗CD70抗体1はWO2004/073656を参照して作製した。実施例で使用した抗CD70抗体1は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。本実施例で使用した抗CD70抗体1の軽鎖アミノ酸配列（配列番号1）及び重鎖アミノ酸配列（配列番号2）を図4に示す。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列（配列番号35）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号36）、CDRL3のアミノ酸配列（配列番号37）、CDRH1のアミノ酸配列（配列番号38）、CDRH2のアミノ酸配列（配列

番号39)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号40)を図16に示す。

[0474] (参考例4:抗CD70抗体2の作製)

抗CD70抗体2はWO2007/038637を参照して作製した。本実施例で使用した抗CD70抗体2は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。本実施例で使用した抗CD70抗体2の軽鎖アミノ酸配列(配列番号3)及び重鎖アミノ酸配列(配列番号4)を図5に示す。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号41)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号42)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号43)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号44)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号45)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号46)を図17に示す。

[0475] (参考例5:抗TROP2抗体1の作製)

抗TROP2抗体1はWO2015/098099を参照して作製した。本実施例で使用した抗TROP2抗体1は、アイソタイプがIgG1である。本実施例で使用した抗TROP2抗体1の軽鎖アミノ酸配列(配列番号5)及び重鎖アミノ酸配列を(配列番号6)図6に示す。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号47)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号48)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号49)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号50)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号51)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号52)を図18に示す。

[0476] (参考例6:抗TROP2抗体2の作製)

抗TROP2抗体1はWO2015/098099を参照して作製した。本実施例で使用した抗TROP2抗体1は、アイソタイプがIgG1である。抗TROP2抗体2は、抗TROP2抗体1にLALA変異を導入した。本実施例で使用した抗TROP2抗体2の軽鎖アミノ酸配列(配列番号7)及び重鎖アミノ酸配列を(配列番号8)図7に示す。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号53)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号5

4)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号55)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号56)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号57)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号58)を図19に示す。

[0477] (参考例7:抗EGFR抗体1の作製)

抗EGFR抗体1は、ベクティビックス点滴静注100mg審査結果報告書(平成22年3月5日 医薬食品局審査管理課)を参照して作製した。本実施例で使用した抗EGFR抗体1は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。本実施例で使用した抗EGFR抗体1の軽鎖アミノ酸配列(配列番号9)及び重鎖アミノ酸配列(配列番号10)を図8に示す。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号59)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号60)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号61)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号62)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号63)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号64)を図20に示す。CDR配列はWO1998/050433を参照した。

[0478] (参考例8:抗EGFR抗体2の作製)

抗EGFR抗体2はWO2002/092771を参照して作製した。本実施例で使用した抗EGFR抗体2は、アイソタイプがIgG1であり、LALA変異を有する。本実施例で使用した抗EGFR抗体2の軽鎖アミノ酸配列(配列番号11)及び重鎖アミノ酸配列(配列番号12)を図9に示す。当該抗体のCDRL1のアミノ酸配列(配列番号65)、CDRL2のアミノ酸配列(配列番号66)、CDRL3のアミノ酸配列(配列番号67)、CDRH1のアミノ酸配列(配列番号68)、CDRH2のアミノ酸配列(配列番号69)、及びCDRH3のアミノ酸配列(配列番号70)を図21に示す。

[0479] (試験例1) レポーター細胞を用いたSTINGアゴニスト活性評価

<レポータージーンアッセイ>

ヒトSTINGアゴニスト活性は、STING経路の下流にあるインターフェロン制御因子3(interferon regulatory fa

ctor-3 (IRF3)) の経路の活性化を確認できる THP1-DualTM細胞 (HAQ変異型) (InvivoGen, CA, US) を用いて評価した。マウス STING アゴニスト活性は RAW-DualTM細胞 (InvivoGen) を用いて評価した。

[0480] アッセイは以下のように実施した。最初に、透明 96 ウェルプレート (Corning, NY, US) に、PBS で希釈した被験化合物を 20 μ L / well で分注した。続いて、アッセイバッファ (10% ウシ血清アルブミンを含む RPMI 1640 培地又は DMEM 培地) に懸濁したレポーター細胞を 180 μ L / well (1×10^5 cells / well) で添加し刺激を開始した。37°C、5% CO₂ 環境下で 24 時間培養した後の遠心上清を回収した。6 μ L の回収した上清を白色 384 ウェルプレートへ添加し、そこへ QUANTI-Luc (InvivoGen) 溶液を 15 μ L 添加した。よく混和した後、プレートリーダー (PerkinElmer, MA, US) を用いて発光を測定した。1. 37 から 100 μ M の ML-RR-CDA $\cdot$ 2Na⁺ (Compound 21 in WO2014/189805) を処理した細胞における最大カウント値を 100%、PBS で処理した細胞でのカウントを 0% とし、被験化合物が 50% のカウントを得るのに必要な濃度を EC50 (μ M) 値として GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, US) を用いて算出した。表 1 にヒト STING アゴニスト活性試験の結果を示す。

[0481] [表1]

化合物番号	THP1-Dual IRF EC50 (μ M)
6b (実施例1)	2.1
34a (実施例2)	0.20
49b (実施例3)	0.41
50b (実施例4)	0.20
ML-RR-CDA $\cdot$ 2Na ⁺	4.2
2' 3' -cGAMP	21.8

[0482] この結果、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される化合物がヒト S

TINGに対するアゴニスト活性を有することが明らかとなった。また、マウスSTINGに対しても、既存のCDNと同等以上のアゴニスト活性を確認した。

[0483] (試験例2) リコンビナントSTING C末結合ドメイン蛋白質を用いたProtein thermal shift assay

(i) 各種発現プラスミドの構築

<ヒトTMEM173発現Plasmidの構築>

ヒトSTING (本明細書中、ヒトTMEM173と称することもある) の哺乳動物細胞発現用プラスミドは、232番目のアルギニン(R)がヒスチジン(H)に変異した(本明細書中、H232変異又はREF変異という)ヒトTMEM173 cDNA Clone (Accession NM_198282.3, H232 (REF) 変異型STING発現プラスミド) (GeneCopoeia, MD, US) を購入した。ヒトH232 (REF) 変異型STINGのアミノ酸配列を配列番号15に、ヌクレオチド配列を配列番号16に示す。また、H232変異型STING発現プラスミドを鋳型とし、Inverse PCR法に基づく部位特異的変異導入を行って野生型STINGおよび変異型STINGの発現プラスミドを作製した。詳細には、先ず2種類のPrimer (5' -CGTGCTGGCATCAAGGATCGGGTTTAC-3' (H232R (WT) fwd) (配列番号25) 及び5' -GTCACCGGTCTGCTGGGGCAGTTTATC-3' (H232R (WT) rev)) (配列番号26) とKOD-Plus-Mutagenesis Kit (SMK-101) (東洋紡) を用いてPCRを実施し、DNAシーケンシングにより目的の野生型(R232) STING発現プラスミドの構築を確認した。ヒト野生型STINGのアミノ酸配列を配列番号13に、ヌクレオチド配列を配列番号14に示す。

[0484] 次に、HAQ (R71H, G230A及びR293Q) 変異型を、野生型STING発現プラスミドと同様の手法にて作製した。詳細には、H232

変異型STING発現プラスミドを鋳型とし、2種類のPrimer (5' -GCTGACCGTGCTGGCATCAAGGATCGGGTTTAC -3' (H232R/G230A fwd) (配列番号27) 及び5' -GGTCTGCTGGGGCAGTTTATCCAGG-3' (H232R/G230A rev) (配列番号28)) とMutagenesis Kitを用いてPCRを実施した。2箇所同時に変異を導入することで、G230A変異型STINGプラスミドを取得した。さらに、G230A変異型STING発現プラスミドを鋳型とし、2種類のPrimer (5' -CACACATCCACTCCAGGTACCGG-3' (R71H fwd) (配列番号29) 及び5' -CAGCTCCTCAGCCAGGCTGCAGAC-3' (R71H rev) (配列番号30)) とMutagenesis Kitを用いてPCRを実施して、R71H/G230A変異型STING発現プラスミドを取得した。

[0485] 続いて、R71H/G230A変異型のSTING発現プラスミドを鋳型とし、2種類のPrimer (5' -CAGACACTTGAGGACATCCTGGCAG-3' (R293Q fwd) (配列番号31) 及び5' -GCAGAAGAGTTTGGCCTGCTCAA-3' (R293Q rev) (配列番号32)) とMutagenesis Kitを用いてPCRを実施し、HAQ (R71H/G230A/R293Q) 変異型の発現プラスミドを取得した。ヒトHAQ変異型STINGのアミノ酸配列を配列番号17に、ヌクレオチド配列を配列番号18に示す。ヒトの野生型STING、REF変異型STING、HAQ変異型STINGのアミノ酸配列を図10に示す。

[0486] <リコンビナントSTING C末結合ドメイン蛋白質発現プラスミドなどの構築>

ヒトSTING C末結合ドメイン (aa139-342) 蛋白質 (UniProt entry Q86WV6) cDNAは、全長のヒトTMEM173 cDNA clone発現プラスミド (野生型、H232変異型お

よびHAQ変異型)から2種類のPrimer (5' -ACCTGTATT
TTCAGGGCCTGGCCCCAGCTGAGATCTCTG-3' (hST Fw_v2) (配列番号33) 及び5' -CAGAATTTCGCA
AGCTTTTAAAGTAACCTCTTCCTTTTTCCTCCTGC-
3' (hST Rv_V3) (配列番号34))を用いたPCRで作製した。
PCR産物は、N末にヒスチジン6塩基からなる6xHisタグ、Avidin
タグ及びTEVプロテアーゼ切断サイトを有するよう、In-Fusion
HD Cloning Kit (タカラバイオ)を使用して大腸菌
発現用ベクターであるpET15bへ挿入し、pET15b-HisAvi
TEV-hSTING (139-342) ヒト野生型、pET15b-His
AviTEV-hSTING (139-342) ヒトREF変異型及びp
ET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトH
AQ変異型の発現プラスミドを構築した。

[0487] マウスSTING C末結合ドメイン (aa138-341) 蛋白質 (U
niProt entry Q3TBT3) 発現用cDNAには、マウスT
MEM173 cDNA配列から138番目から341番目のアミノ酸に該
当するcDNAをeurofins Genomicsで人工合成したもの
を使用した。マウスSTINGのアミノ酸配列を配列番号19に、ヌクレオ
チド配列を配列番号20に示す。合成したcDNAは、N末にヒスチジン6
塩基からなる6xHisタグ、Avidinタグ及びTEVプロテアーゼ切
断サイトを有するようIn-Fusion HD Cloning Kit
を使用して大腸菌発現用ベクターであるpET15bへ挿入し、pET15
b-HisAviTEV-mSTING (138-341) マウス野生型の
発現プラスミドを構築した。

pCDF_Duet-1ベクターに人工合成した大腸菌BirA (Uni
Prot entry P06709) cDNAを挿入し、pCDF_Du
et-1 BirA (1-321) 発現プラスミドを構築した。

[0488] (ii) STING C末結合ドメイン蛋白質の調製法

作製した各pET15b-HisAviTEV-hSTING (139-342) (ヒト野生型 (Hu-WT)、ヒトREF変異型 (Hu-REF) 及びヒトHAQ変異型 (Hu-HAQ) のSTING C末結合ドメイン蛋白質) 発現プラスミド及びpET15b-HisAviTEV-mSTING (138-341) (マウス野生型 (Ms-WT) のSTING C末結合ドメイン蛋白質) 発現プラスミドはそれぞれ、pCDF_Duet-1 BirA (1-321) 発現プラスミドと同時にCompetent E. coli Rosetta 2 (DE3) (Merck Millipore, MA, US) に形質転換し、各HisAviTEV-STING発現株を作製した。これらの発現株を100 µg/mLアンピシリン、50 µg/mLストレプトマイシン、及び30 µg/mLカナマイシンを含むTB培地に添加し、37°Cで培養後、100 µM IPTGで誘導発現しさらに16°Cで培養した。

- [0489] 培養液を遠心し、得られた菌体を50 mM HEPES pH8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM DTT, 5% (w/v) glycerol, Complete EDTA free に懸濁後、凍結融解した。Lysozyme、DNase Iを添加した後、超音波破碎により蛋白質を抽出し、遠心を経て上清を回収した。得られた上清をAKTAexpressクロマトグラフィーシステム (GE Healthcare, IL, US) を用いてHisTrap FFカラム (GE Healthcare) で精製し、Superdex200 16/60 カラム (GE Healthcare) に通してBuffer (20 mM HEPES pH7.5, 120 mM NaCl, 20% Glycerol, 0.8 mM DTT) で溶出した。SECで目的分子量の蛋白質を含む画分回収し、His-Avi-TEV-hSTING (139-342) ヒト野生型蛋白質、HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトREF変異型蛋白質、HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトHAQ変異型蛋白質及びHis-Avi-TEV-mSTING (

138-341) マウス野生型蛋白質として回収した。蛋白質濃度はNanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, US) を用いて測定し、使用まで-80℃で凍結保存した。

[0490] HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒト野生型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号21、HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトREF変異型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号22、HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒトHAQ変異型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号23、His-Avi-TEV-mSTING (138-341) マウス野生型蛋白質のアミノ酸配列を配列番号24に示す。

[0491] (iii) STING結合試験

STING C末結合ドメイン蛋白質への化合物の結合性は、蛋白質の熱変性温度の上昇を指標とするProtein thermal shift assayにより行った。

[0492] 詳細には、384ウェルのリアルタイムPCRプレートへ、アッセイバッファ(20mM Tris-HCl pH7.5, 120mM NaCl)を用い、3μLの被験化合物(最終濃度0.5mM)、3μLのSYPRO Orange Protein Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) (最終濃度20×濃度)と6μLのSTING蛋白質を混合し、プレートシェーカーを用いて混和した。リアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific)により、温度を毎秒0.03℃の速度で25℃から95℃まで上昇させ、蛋白質の熱変性温度をSYPRO Orangeが発する蛍光を指標に測定した。得られた測定値は、解析ソフトウェアであるProtein Thermal Shift software (Thermo Fisher Scientific)を用い、蛍光強度の増加速度が最大値を示す温度としてT_m (the midpoint of the unfolding transition) (℃)を求めた。各化合物のT_m値から、化合物

無添加ウェルの T_m 値を差し引くことで、被験化合物による T_m のシフトを ΔT_m (°C) として算出した。STING蛋白質に対する結合試験の結果を表2に示す。

[0493] [表2]

化合物番号	ΔT_m (°C)			
	Hu-WT	Hu-REF	Hu-HA Q	Ms-WT
6b (実施例1)	8.4	3.4	11.3	12.9
34a (実施例2)	14.7	8.8	18.9	20.3
49b (実施例3)	12.6	6.6	16.1	19.3
50b (実施例4)	12.3	6.3	15.3	7.4
ML-RR-CDA $\cdot 2Na^+$	7.0	2.7	12.7	15.2
2' 3' -cGAMP	13.7	4.1	24.3	25.8

[0494] この結果、本発明の抗体薬物コンジュゲートに使用される化合物がヒトの野生型STING及び変異型STING、マウスの野生型STINGに対して結合活性を有することが明らかとなった。

[0495] (試験例3) HCC細胞アッセイ

TROP2及びSTINGを恒常的に高発現する株として、American Type Culture Collection社より購入したヒト乳がん細胞株HCC1954 (CRL-2338) 細胞を用いて、IFIT1プロモーターレポーター遺伝子を安定発現させたHCC1954-IFIT1レポーター細胞を作製した。詳細には、購入したヒトIFIT1 (ISG-56) promoter reporterプラスミド (GeneCopoeia, HPRM40290-PG04) を、FuGene HD (Promega) を用いてHCC1954細胞へトランスフェクションした。細胞を $1.0 \mu\text{g/mL}$ Puromycin (Life Technologies) 添加培地で継代して安定発現株を作製し、クローニングを行なって評価用細胞株を取得した。アッセイバッファ (10%ウシ血清アルブミンを含むRPMI 1640培地) に懸濁したHCC1954-IFIT1レポーター細胞を $90 \mu\text{L/well}$ ($2.5 \times 10^4 \text{ cells/well}$)

で384ウェルプレートに分注した。翌日、試験化合物はPBSによって希釈し、10 μ Lを添加し刺激を開始した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂環境下で24時間培養した後の遠心上清を回収した。6 μ Lの回収した上清を白色384ウェルプレートへ添加し、そこへQUANTI-Luc (InvivoGen) 溶液を15 μ L添加した。よく混和した後、プレートリーダー (PerkinElmer, MA, US) を用いて発光を測定した。

結果を図11に示す。縦軸は発光カウント数、横軸は各試験化合物の濃度を示している。図中の白丸線は、参考例6で作製した抗TROP2抗体2、図中の黒丸線は、参考例6で作成した抗TROP2抗体2に実施例2の化合物34aをコンジュゲートさせた抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)、図中の黒三角線は、抗TROP2抗体2に実施例3の化合物49bをコンジュゲートさせた抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(2)、図中の黒四角線は、抗TROP2抗体2に実施例4の化合物50bをコンジュゲートした抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(3)を示す。抗TROP2抗体2は発光カウントを増加させなかったのに対し、抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)、(2)、(3)は濃度依存的にカウント数を上昇させた。以上より、抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)、(2)、(3)がヒトSTING経路の活性化能を有することが明らかとなった。

[0496] (試験例4) CT26, WT及びCT26, WT-hCD70細胞株とマウス骨髄由来樹状細胞との共培養アッセイ系

American Type Culture Collection社より購入したマウス大腸がん細胞株CT26, WT (CRL 2638) にヒトCD70遺伝子 (NP_001243) を導入したCT26, WT-hCD70細胞を作成した。詳細には、ヒトCD70遺伝子を挿入したpLVSLINレンチウイルスベクター (タカラバイオ) を作成し、Lenti-X293T細胞株 (タカラバイオ) にLentiviral High Titer Packaging Mix (タカラバイオ) を用いて導入し、上澄

を回収してCT26.WTに感染させた。細胞は $10\mu\text{g}/\text{mL}$ puro mycin (Thermo Fisher Scientific) 添加培地で維持した。

[0497] 5週齢の雌性BALB/cマウス(BALB/cAnNCrICrIj)(日本チャールス・リバー)の大腿骨よりマウス骨髓細胞を採取した。マウス骨髓細胞は $20\mu\text{g}/\text{mL}$ murine GM-CSF (PEPROTECH) 存在下で7日間培養し、マウス骨髓由来樹状細胞を得た。96ウェルプレート1ウェルにつき、CT26.WTもしくはCT26.WT-hCD70細胞株を 1.5×10^5 細胞、マウス骨髓由来樹状細胞を 1×10^5 細胞播種した。試験化合物はRPMI培地(Invitrogen)によって希釈し、 $200\mu\text{L}$ を添加した。20時間培養後、細胞をFCMバッファ(HBSS(Wako), 5% FBS(Hyclone), 1mM EDTA(THERMO FISHER))で洗浄し、FCM抗体(抗マウスCD16/32(Becton Dickinson), 抗マウスCD45, 抗マウスCD11c, 抗マウスI-A/I-E, 抗マウスCD86(いずれもBIOLEGEND))を用いて染色した。再度FCMバッファで洗浄後、Fortessa(BD Biosciences)にて解析した。CD45⁺, CD11c⁺, I-A/I-E⁺分画においてCD86のMFIを算出後、試験化合物非添加群に対する割合を計算した。結果を図12に示す。図中のDCはマウス骨髓由来樹状細胞と各試験化合物、図中のDC+CT26.WTはマウス骨髓由来樹状細胞及びCT26.WTと各試験化合物、図中のDC+CT26.WT-hCD70はマウス骨髓由来樹状細胞及びCT26.WT-hCD70と各試験化合物の培養結果を示す。縦軸は非添加群に対するMFIの割合、横軸は各試験化合物を示している。図中の抗CD70抗体1-CDN(1)は、参考例3の抗CD70抗体1に実施例2の化合物34aをコンジュゲートしたものであり、図中の抗CD70抗体2-CDN(1)は、参考例4の抗CD70抗体2に実施例2の化合物34aをコンジュゲートしたものである。実施例2の化合物34aは全ての条件でマウス樹状細胞上の

CD86発現を上昇させ、抗CD70抗体1および抗CD70抗体2はいずれの条件でもCD86発現を上昇させなかった。これに対し抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート(1)、および抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート(1)はマウス骨髄由来樹状細胞をCT26.WT-hCD70と培養した場合のみマウス樹状細胞上のCD86発現が増強した。以上より、抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート(1)、および抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート(1)のCD70依存的な樹状細胞活性化が確認された。

[0498] (試験例5) 抗腫瘍試験(1)

American Type Culture Collection社より購入したマウス大腸がん細胞株CT26.WT(CRL2638)にヒトTROP2遺伝子(NP_002344.2)を導入したCT26.WT-hTROP2細胞を作成した。詳細には、pQCIXNベクター(タカラバイオ)をBamHIおよびEcoRIで切断してT4 DNAポリメラーゼで切断後に切断末端を平滑化し、GatewayリーディングフレームカセットAとライゲーションして作製したpQCIXN-DENベクターへ、ヒトTROP2をGatewayシステム(Thermo Fisher Scientific)を用いて挿入した。ヒトTROP2挿入pQCIXN-DENレトロウイルスベクターをEcoPack2-293細胞株(タカラバイオ)にLipofectamine 3000(Thermo Fisher Scientific)を用いて導入し、上澄を回収してCT26.WTに感染させた。細胞は250 μ g/mL Geneticin(Thermo Fisher Scientific)添加培地で維持した。

抗体、および抗体-CDNコンジュゲートは酢酸塩緩衝液(10mM Acetate Buffer, 5% Sorbitol, pH5.5)(ナカライテスク)によって希釈して使用した。

[0499] CT26.WT-hTROP2細胞を生理食塩水に懸濁し、 2.0×10^6

細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し(Day 0)、7日後に無作為に群分けを実施した。抗TROP2抗体1、および抗TROP2抗体1-CDNコンジュゲート(1)は $30\mu\text{g}/\text{匹}$ ($1.5\text{mg}/\text{kg}$ 相当)の用量で、抗TROP2抗体2、および抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)は $3.0\text{mg}/\text{kg}$ の用量でDay 7に計1回尾静脈内投与した。また、ビヒクル群として酢酸塩緩衝液を投与する群を設定した。各群のマウス匹数は8匹とした。

抗TROP2抗体1および抗TROP2抗体1-CDNコンジュゲート(1)の結果を図13に示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白丸線は、参考例5で作製した抗TROP2抗体1投与群、白逆三角線は、抗TROP2抗体1に実施例1の化合物6bをコンジュゲートさせた抗TROP2抗体1-CDNコンジュゲート(1)投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群および抗TROP2抗体1投与群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗TROP2抗体1-CDNコンジュゲート(1)投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

[0500] 抗TROP2抗体2および抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)の結果を図14に示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白丸線は、参考例6で作製した抗TROP2抗体2投与群、白逆三角線は、抗TROP2抗体2に実施例2の化合物34aをコンジュゲートさせた抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)投与群を示す。縦軸は腫瘍体積(mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群および抗TROP2抗体投与群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗TROP2抗体2-CDNコンジュゲート(1)投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、抗TROP2抗体が効果を示さない薬効モデルにおいて、抗TROP2抗体-CDNコンジュゲートの静脈内投与による抗体標的依存的な抗腫瘍効果が確認された。

[0501] (試験例6) 抗腫瘍試験(2)

American Type Culture Collection社

より購入したマウス大腸がん細胞株CT26, WT (CRL 2638) にヒトEGFR遺伝子 (NP_005219.2) を導入したCT26, WT-hEGFR細胞を作成した。詳細には、ヒトEGFR遺伝子を挿入したpLVSI-Nレンチウイルスベクター (タカラバイオ) を作成し、Lentiviral High Titer Packaging Mix (タカラバイオ) を用いて導入し、上澄を回収してCT26, WTに感染させた。細胞は $10\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (Thermo Fisher Scientific) 添加培地で維持した。

[0502] CT26, WT-hEGFR細胞を生理食塩水に懸濁し、 3×10^6 細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し (Day 0)、12日後に無作為に群分けを実施した。抗EGFR抗体1、抗EGFR抗体2、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート (1)、および抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート (1) は $1.5\text{mg}/\text{kg}$ の用量で、Day 12に計1回尾静脈内投与した。またビヒクル群として酢酸塩緩衝液を投与する群を設定した。各群のマウス匹数は8匹とした。

[0503] 結果を図15に示す。図中の黒四角線はビヒクル群、白三角線は参考例7で作製した抗EGFR抗体1投与群、黒三角線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート (1) 投与群、白丸線は参考例8で作製した抗EGFR抗体2投与群、黒丸線は抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート (1) 投与群を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3)、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。抗EGFR抗体1投与群、および抗EGFR抗体2投与群は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート (1) 投与群、および抗EGFR抗体2-CDNコンジュゲート (1) 投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

[0504] 以上より、抗EGFR抗体が抗腫瘍効果を示さないモデルを用いて、抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0505] (試験例7) 抗腫瘍試験 (3)

抗体、および抗体-CDNコンジュゲートは酢酸塩緩衝液（10 mM Acetate Buffer, 5% Sorbitol, pH 5.5）（ナカライテスク）によって希釈して使用した。

American Type Culture Collection社より購入したヒト腎がん細胞株Caki-1（HTB-46）細胞を生理食塩水で50%希釈したマトリゲル（CORNING）中に懸濁し、 2.5×10^6 細胞をBALB/c- ν マウスの右腋窩部に皮下移植し（Day 0）、13日後に無作為に群分けを実施した。抗CD70抗体1、抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート（1）及び抗CD70抗体2、抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（1）は1.5 mg/kgの用量でDay 13に計1回尾静脈内投与した。また、ビヒクル群として酢酸塩緩衝液を投与する群を設定した。各群のマウス匹数は8匹とした。

[0506] 結果を図22に示す。図中の抗CD70抗体1-コンジュゲート（1）は、参考例3の抗CD70抗体1に実施例2の化合物34aをコンジュゲートしたものであり、図中の抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（1）は、参考例4の抗CD70抗体2に実施例2の化合物34aをコンジュゲートしたものである。図中の黒四角線はビヒクル群、白三角線は抗CD70抗体1投与群、白逆三角線は抗CD70抗体2投与群、白ひし形線は抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート（1）投与群、白丸線は抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（1）投与群を示す。縦軸は腫瘍体積（ mm^3 ）、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群、抗CD70抗体1投与群、抗CD70抗体2投与群では腫瘍の増殖が進行した。これに対し、抗CD70抗体1-CDNコンジュゲート（1）投与群及び抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（1）投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、抗CD70抗体が効果を示さない薬効モデルにおいて、いずれの抗CD70抗体-CDNコンジュゲートの静脈内投与でも抗体標的依存的な抗腫瘍効果が確認された。

[0507] （試験例8）抗腫瘍試験（4）

抗体、および抗体-CDNコンジュゲートは酢酸塩緩衝液（10 mM Acetate Buffer, 5% Sorbitol, pH 5.5）（ナカライテスク）によって希釈して使用した。

American Type Culture Collection社より購入したヒト腎がん細胞株A-498（HTB-44）細胞を生理食塩水に懸濁し、 3.0×10^6 細胞をBALB/c-*nu*マウスの右腋窩部に皮下移植し（Day 0）、20日後に無作為に群分けを実施した。抗CD70抗体2及び抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（2）は1.0 mg/kgの用量でDay 20に計1回尾静脈内投与した。また、ビヒクル群として酢酸塩緩衝液を投与する群を設定した。各群のマウス匹数は6匹とした。

結果を図23に示す。図中の抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（2）は、薬物平均結合数が約2のMSG型糖鎖リモデリング抗体を使用した抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はビヒクル群、白三角線は抗CD70抗体2投与群、白逆三角線は抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（2）投与群を示す。縦軸は腫瘍体積（mm³）、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ビヒクル群では腫瘍の増殖が進行した。抗CD70抗体2投与群は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗CD70抗体2-CDNコンジュゲート（2）投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、抗CD70抗体が効果を示さない薬効モデルにおいて、抗CD70抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

[0508] （試験例9）抗腫瘍試験（5）

American Type Culture Collection社より購入したマウス大腸がん細胞株CT26.WT（CRL2638）に抗EGFR抗体1のエピトープ部位をヒト型に置換したヒトマウスキメラEGFR遺伝子（NP_005219.2）を導入したCT26.WT-*chimeric* EGFR細胞を作成した。詳細には、ヒトマウスキメラEGFR遺

伝子を挿入したpLVSI-Nレンチウイルスベクター（タカラバイオ）を作成し、Lenti-X293T細胞株（タカラバイオ）にLentiviral High Titer Packaging Mix（タカラバイオ）を用いて導入し、上澄を回収してCT26.WTに感染させた。細胞は2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin（Thermo Fisher Scientific）添加培地で維持した。

CT26.WT-chimeraEGFR細胞を生理食塩水に懸濁し、 1×10^6 細胞をBALB/cマウスの右腋窩部に皮下移植し（Day 0）、7日後に無作為に群分けを実施した。化合物34aは0.01 mg/kg、抗EGFR抗体1は0.98 mg/kg、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（2）は1.0 mg/kgの用量で、Day 7に計1回尾静脈内投与した。化合物番号34a及び抗EGFR抗体1の投与量は、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（2）を構成する各成分の当量である。またピヒクル群として酢酸塩緩衝液を投与する群を設定した。各群のマウス匹数は8匹とした。

[0509] 結果を図24に示す。図中の抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（2）は、薬物平均結合数が約2のMSG型糖鎖リモデリング抗体を使用した抗体-CDNコンジュゲートである。図中の黒四角線はピヒクル群、白三角線は抗EGFR抗体1投与群、白ひし形線は化合物34a投与群、白四角線は抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（2）投与群を示す。縦軸は腫瘍体積（ mm^3 ）、横軸は腫瘍移植後の日数を示している。ピヒクル群は腫瘍の増殖が進行した。化合物34a投与群及び抗EGFR抗体1投与群は腫瘍の増殖を抑制しなかった。これに対し、抗EGFR抗体1-CDNコンジュゲート（2）投与群では腫瘍の増殖が著しく抑制された。

以上より、抗EGFR抗体が抗腫瘍効果を示さないモデルを用いて、抗EGFR抗体-CDNコンジュゲートの強い抗腫瘍効果が確認された。

産業上の利用可能性

[0510] 本発明により、強いSTINGアゴニスト活性を有し、強い抗腫瘍効果を

示す新規CDN誘導体を含む抗体薬物コンジュゲートが提供される。該抗体薬物コンジュゲートは、STINGアゴニスト活性が関連する疾患（例えば、がん）の治療剤として有用である。

配列表フリーテキスト

- [0511] 配列番号1：抗CD70抗体1の軽鎖のアミノ酸配列
配列番号2：抗CD70抗体1の重鎖のアミノ酸配列
配列番号3：抗CD70抗体2の軽鎖のアミノ酸配列
配列番号4：抗CD70抗体2の重鎖のアミノ酸配列
配列番号5：抗TROP2抗体1の軽鎖のアミノ酸配列
配列番号6：抗TROP2抗体1の重鎖のアミノ酸配列
配列番号7：抗TROP2抗体2の軽鎖のアミノ酸配列
配列番号8：抗TROP2抗体2の重鎖のアミノ酸配列
配列番号9：抗EGFR抗体1の軽鎖のアミノ酸配列
配列番号10：抗EGFR抗体1の重鎖のアミノ酸配列
配列番号11：抗EGFR抗体2の軽鎖のアミノ酸配列
配列番号12：抗EGFR抗体2の重鎖のアミノ酸配列
配列番号13：ヒト野生型STINGのアミノ酸配列
配列番号14：ヒト野生型STINGのヌクレオチド配列
配列番号15：ヒトH232（REF）変異型STINGのアミノ酸配列
配列番号16：ヒトH232（REF）変異型STINGのヌクレオチド配列
配列番号17：ヒトHAQ変異型STINGのアミノ酸配列
配列番号18：ヒトHAQ変異型STINGのヌクレオチド配列
配列番号19：マウスSTINGのアミノ酸配列
配列番号20：マウスSTINGのヌクレオチド配列
配列番号21：HisAviTEV-hSTING（139-342）ヒト野生型蛋白質のアミノ酸配列
配列番号22：HisAviTEV-hSTING（139-342）ヒト

REF変異型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号23: HisAviTEV-hSTING (139-342) ヒト

HAQ変異型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号24: His-Avi-TEV-mSTING (138-341)

マウス野生型蛋白質のアミノ酸配列

配列番号25～34: プライマーの配列

配列番号35: 抗CD70抗体1のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号36: 抗CD70抗体1のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号37: 抗CD70抗体1のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号38: 抗CD70抗体1のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号39: 抗CD70抗体1のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号40: 抗CD70抗体1のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号41: 抗CD70抗体2のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号42: 抗CD70抗体2のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号43: 抗CD70抗体2のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号44: 抗CD70抗体2のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号45: 抗CD70抗体2のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号46: 抗CD70抗体2のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号47: 抗TROP2抗体1のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号48: 抗TROP2抗体1のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号49: 抗TROP2抗体1のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号50: 抗TROP2抗体1のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号51: 抗TROP2抗体1のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号52: 抗TROP2抗体1のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号53: 抗TROP2抗体2のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号54: 抗TROP2抗体2のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号55: 抗TROP2抗体2のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号56: 抗TROP2抗体2のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号57：抗TROP2抗体2のCDRH2のアミノ酸配列
配列番号58：抗TROP2抗体2のCDRH3のアミノ酸配列
配列番号59：抗EGFR抗体1のCDRL1のアミノ酸配列
配列番号60：抗EGFR抗体1のCDRL2のアミノ酸配列
配列番号61：抗EGFR抗体1のCDRL3のアミノ酸配列
配列番号62：抗EGFR抗体1のCDRH1のアミノ酸配列
配列番号63：抗EGFR抗体1のCDRH2のアミノ酸配列
配列番号64：抗EGFR抗体1のCDRH3のアミノ酸配列
配列番号65：抗EGFR抗体2のCDRL1のアミノ酸配列
配列番号66：抗EGFR抗体2のCDRL2のアミノ酸配列
配列番号67：抗EGFR抗体2のCDRL3のアミノ酸配列
配列番号68：抗EGFR抗体2のCDRH1のアミノ酸配列
配列番号69：抗EGFR抗体2のCDRH2のアミノ酸配列
配列番号70：抗EGFR抗体2のCDRH3のアミノ酸配列